

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Jakub Zeman**

Studium variability IRES elementů viru hepatitidy typu C

Variability of the IRES elements of the hepatitis C virus

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2013

# Prohlášení

---

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2013

---

Bc. Jakub Zeman

# Poděkování

---

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří byli jakýmkoliv způsobem nápomocni vzniku této práce:

V první řadě děkuji svým rodičům, kteří mě materiálně a psychicky podporovali po celou dobu dosavadního studia.

Velké díky patří Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D., který byl po čtyři roky mým příkladným školitelem a skvělým učitelem ve věcech laboratorní praxe i teorie. Za tu dobu mi předal spoustu cenných zkušeností a rad, věnoval mi mnoho svého času a byl vždy nablízku, když jsem potřeboval pomoc.

Můj vděk patří rovněž všem současným i bývalým členům Laboratoře biochemie RNA, kteří se podíleli na mé práci v laboratoři odbornou radou, dobrým nápadem, nezištnou pomocí či teplým lidským slovem v těžkých chvílích. Budete mi chybět.

Zvláště děkuji také vedoucímu laboratoře RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D.

Neocenitelná pro mě byla rovněž podpora a trpělivost mých blízkých a přátel, kteří se mnou sdíleli radosti i strasti života v laboratoři i mimo ni.

Díky Vám všem za to, co jste pro mě vykonali.

# Abstrakt

---

Virus hepatitidy typu C (HCV) obsahuje na 5' konci svého RNA genomu vnitřní vazebné místo pro ribosom (IRES). IRES HCV je schopno přímo na sebe vázat 40S malou ribosomální podjednotku a eukaryotický iniciační faktor eIF3 a po sestavení kompletního 80S ribosomu zahájit translaci.

Jako inhibitory funkce IRES HCV se uplatňují molekuly různé povahy. Z klinického hlediska jsou slibnou skupinou nízkomolekulární sloučeniny. V první řadě se proto tato diplomová práce zabývá přípravou systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV v knihovně chemických sloučenin. Byly připraveny různé varianty vektorů nesoucí bicistronické kazety. Po ověření jejich funkčnosti pomocí transientní transfekce savčích buněčných linií byly ustaveny stabilní savčí buněčné linie. Díky těmto stabilním buněčným liniím bude možno proces hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV zautomatizovat.

Druhým tématem je studium variability sekvencí IRES HCV izolovaných ze vzorků od pacientů. Vzorky IRES HCV byly analyzovány pomocí gelové elektroforesy v teplotním gradientu (TGGE). Vybrané vzorky byly osekvenovány, vloženy do vektoru s bicistronickou kazetou a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Byla tak určeno, jak ovlivňují konkrétní mutace v sekvenci IRES HCV míru translace závislé na daném IRES. Porovnáním dvou skupin vzorků bylo navíc vyvráceno, že by došlo k umělému vzniku nalezených mutací experimentálním uspořádáním.

Práce přispěla k prohloubení znalostí o struktuře a dynamice IRES HCV a účinků inhibitorů na ně.

## Klíčová slova

---

virus hepatitidy typu C, HCV, hepatitida C, vnitřní vazebné místo pro ribosom, IRES, translace, iniciace translace, translace nezávislá na čepičce, inhibitory IRES HCV, nízkomolekulární inhibitory, stabilní buněčná linie

# Abstract

---

Hepatitis C virus (HCV) has an internal ribosomal binding site (IRES) located near the 5' end of its genome. The HCV IRES is capable of direct binding to the 40S small ribosomal unit and eukaryotic initiation factor eIF3, and can initiate translation after the assembly of the whole 80S ribosome.

Various molecular types can act as IRES inhibitors. Small molecule compounds seem to be the most promising agent for use in the clinic. The main objective of the thesis was to develop a system for searching for small molecule compound inhibitors of HCV IRES in a library of chemical compounds. Several variants of vector carrying bicistronic cassettes were prepared. After validating their functionality by transient transfection of mammalian cell cultures, mammalian stable cell lines were established. These stable cell lines will allow for automatization of the search for small molecule compound inhibitors of HCV IRES.

Our second objective was to study the variability of HCV IRES sequences in patient samples. The samples were analysed by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). Select specimen were sequenced, cloned into a vector with bicistronic cassette and analysed by flow cytometry. In this was we evaluated the effect of specific mutations in the HCV IRES sequence on the level of IRES dependent translation. By comparing two isolated sets of samples we refuted the possibility of artificial generation of the identified mutations by the experimental setup.

The study has contributed to deepening our knowledge of the HCV IRES structure, dynamics, and their response to inhibitors.

## Keywords

---

hepatitis C virus, HCV, hepatitis C, internal ribosome entry site, IRES, translation, translation initiation, cap-independent translation, HCV IRES inhibitors, small molecule compounds, stable cell line

# Obsah

---

1. Úvod.....	11
2. Cíle práce .....	12
3. Literární přehled.....	13
3.1. Hepatitida C .....	14
3.2. Iniciace translace .....	15
3.2.1. Iniciace translace závislá na čepičce .....	15
3.2.2. Iniciace translace závislá na vnitřním vazebném místě pro ribosom .....	16
3.3. Vnitřní vazebné místo pro ribosom HCV .....	18
3.3.1. Sekundární struktury IRES HCV a jejich funkce .....	18
3.3.2. Terciální struktura IRES HCV .....	24
3.3.3. Podobnost IRES HCV s IRES dalších virů .....	24
3.4. Inhibitory IRES HCV .....	25
3.4.1. Inhibice pomocí oligonukleotidů .....	25
3.4.2. Inhibice pomocí aptamerů a kompetitivních inhibitorů .....	26
3.4.3. Inhibice pomocí nízkomolekulárních látek .....	27
3.4.3.1. Vitamin B <sub>12</sub> .....	28
3.4.3.2. Fenazinové deriváty .....	30
3.4.3.3. Inhibitory aminoglykosidového typu .....	31
3.4.3.4. Benzimidazolové deriváty .....	32
3.4.3.5. Biarylguanidinové deriváty .....	38
3.4.3.6. Mifepriston .....	39
4. Materiál a metody .....	40
4.1. Materiál.....	40
4.1.1. Chemikálie .....	40
4.1.2. Roztoky .....	42

4.1.3.	Enzymy .....	44
4.1.4.	Komerční soupravy .....	44
4.1.5.	Standardy molekulových hmotností.....	45
4.1.6.	Vektory.....	46
4.1.7.	Oligonukleotidové primery .....	49
4.1.8.	Mikroorganismy .....	50
4.1.9.	Buněčné kultury .....	50
4.1.10.	Kultivační média .....	50
4.1.10.1.	Bakteriální kultivační média .....	50
4.1.10.2.	Kultivační média buněčných kultur .....	51
4.2.	Metody.....	51
4.2.1.	Práce s mikroorganismy .....	51
4.2.1.1.	Kultivace bakterií .....	51
4.2.1.2.	Skladování mikroorganismů .....	51
4.2.2.	Práce se savčími buněčnými kulturami.....	51
4.2.2.1.	Kultivace buněčných kultur .....	51
4.2.2.2.	Pasážování buněčných kultur .....	51
4.2.2.3.	Skladování buněčných kultur .....	52
4.2.3.	Práce s DNA.....	52
4.2.3.1.	Izolace DNA.....	52
4.2.3.1.1.	Minipreparace plazmidů z <i>Escherichia coli</i> .....	52
4.2.3.1.2.	Midipreparace plazmidů z <i>E. coli</i> .....	53
4.2.3.1.3.	Minipreparace plazmidů z <i>E. coli</i> pomocí soupravy XNAPS .....	53
4.2.3.1.4.	Izolace DNA z agarosového gelu pomocí FastBack DNA Minispin Kit .....	54
4.2.3.1.5.	Přečištění produktu PCR reakce pomocí High Pure PCR Product Purification Kit.....	55
4.2.3.1.6.	Precipitace DNA ethanolem v prostředí octanu sodného.....	55
4.2.3.2.	Měření koncentrace DNA .....	55



4.2.3.3.	Agarosová elektroforesa.....	56
4.2.3.4.	Gelová elektroforesa v teplotním gradientu (TGGE).....	56
4.2.3.5.	Barvení gelů stříbrem .....	59
4.2.3.6.	PCR .....	60
4.2.3.7.	Modifikace DNA.....	62
4.2.3.7.1.	Štěpení restrikčními endonukleasami.....	62
4.2.3.7.2.	Deforsorylace konců DNA.....	63
4.2.3.7.3.	Zatupení přesahujících konců molekul DNA .....	63
4.2.3.7.4.	Úprava konců DNA pomocí soupravy Fast DNA End Repair Kit .....	64
4.2.3.7.5.	Ligace molekul DNA .....	64
4.2.3.8.	Vnášení DNA do mikroorganismů.....	65
4.2.3.8.1.	Příprava elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	65
4.2.3.8.2.	Transformace buněk <i>E. coli</i> elektroporací.....	65
4.2.3.9.	Vnášení DNA do tkáňových kultur .....	66
4.2.3.9.1.	Transientní transfekce buněčné kultury.....	66
4.2.3.9.2.	Stabilní transfekce buněčné kultury .....	66
4.2.4.	Práce s proteiny .....	69
4.2.4.1.	Měření luciferázových aktivit .....	69
4.2.4.2.	Měření fluorescence průtokovou cytometrií .....	70
4.2.5.	Programové vybavení.....	71
5.	Výsledky .....	72
5.1.	Příprava systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV .....	72
5.1.1.	Příprava vektorů nesoucích bicistronické kazety .....	72
5.1.1.1.	Izolace bicistronických kazet .....	72
5.1.1.2.	Výměna promotoru vektoru pcDNA5/FRT .....	73
5.1.1.3.	Vložení reportérových kazet do vektoru pcDNA5/FRT/TO .....	74
5.1.1.4.	Vložení reportérových kazet do vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ .....	76

5.1.1.5.	Oprava mutací v sekvenci IRES HCV v bicistronických kazetách.....	77
5.1.1.6.	Shrnutí výsledků konstrukce nových vektorů .....	79
5.1.2.	Transientní transfekce savčích buněčných linií nově připravenými vektory	80
5.1.3.	Savčí buněčné linie stabilně transfekované nově připravenými vektory ...	85
5.1.4.	Shrnutí .....	87
5.2.	Hledání a studium mutací IRES HCV ve vzorcích od pacientů.....	87
5.2.1.	Vložení vzorků IRES HCV od pacientů do vektoru pRG.....	88
5.2.2.	Příprava vzorků pro gelovou elektroforezu v teplotním gradientu. ....	88
5.2.3.	Analýza vzorků pomocí gelové elektroforezy v teplotním gradientu .....	89
5.2.4.	Analýza vzorků pomocí průtokové cytometrie .....	92
5.2.5.	Shrnutí .....	93
6.	Diskuse.....	94
6.1.	Využití buněčné linie HEK 293 pro studium IRES HCV .....	94
6.2.	Umlčování cytomegalovirového promotoru v savčích buněčných liniích .....	94
6.3.	Rozdílná míra luciferasových aktivit mezi biologickými opakováními transientní transfekce buněčných kultur .....	95
6.4.	Pročítání ribosomu na bicistronních kazetách .....	96
6.5.	Odlišné hodnoty poměru aktivit luciferas při použití buněčné linie CCL13 oproti jiným buněčným liniím .....	96
6.6.	Problémy při analýze vzorků pomocí gelové elektroforezy v teplotním gradientu .....	97
6.7.	Ovlivnění výsledků analýzy mutací ve vzorcích IRES HCV prostřednictvím experimentálního uspořádání .....	97
6.8.	Vliv nalezených mutací ve vzorcích IRES HCV na míru translace závislé na IRES.....	98
6.9.	Návrh mechanismu inhibice IRES HCV pomocí vitamínu B <sub>12</sub> .....	98
6.10.	Perspektiva ve výzkumu chemických inhibitorů IRES HCV.....	100
7.	Souhrn .....	101

8. Přílohy.....	102
9. Seznam použité literatury.....	105

# Seznam zkratek

---

Zkratka	Anglický význam zkratky	Český význam zkratky
2-DOS		2-deoxystreptamin
AK		aminokyselina
bp	base pair	pár bází
CSFV	Classical swine fever virus	virus klasického moru prasat
DAP		3,5-diaminopiperidin
eIF	eukaryotic initiation factor	eukaryotický iniciační faktor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	metoda neradioaktivního přenosu energie mezi dvěma chromofory
HCC	hepatocellular carcinoma	karcinom odvozený od jaterních buněk
HCV	Hepatitis C virus	Virus hepatitidy typu C
HIV	Human Immunodeficiency Virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IRES	Internal ribosome entry site	interní vazebné místo pro ribosom
kb	kilobase	tisíc bází
kDa	kilodalton	kilodalton; 1 dalton odpovídá 1/12 hmotnosti atomu $^{12}\text{C}$ v základním stavu, tj. zhruba $1,66 \times 10^{-27}$ kg
NMR		spektroskopie nukleární magnetické resonance
NTRs	nontranslated regions	netranslatované oblasti
O.D.		optická denzita
RE		restrikční endonukleasa
s-B <sub>12</sub>		sérová koncentrace vitamínu B <sub>12</sub>
SRL	sarcin-ricin loop	motiv sarcin-ricinové smyčky
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis	Gelová elektroforesa v teplotním gradientu
A, G, C, T, U		báze adenin, guanin, cytosin, thymin a uracil

# 1. Úvod

---

Virus hepatitidy typu C (HCV) je obalený jednořetězcový virus s pozitivním vláknem (+ssRNA virus) jenž náleží do rodu *Hepacivirus* spadajícího do čeledi *Flaviviridae*. Jeho genom obsahuje na 5' konci dlouhý nepřekládaný úsek s bohatou sekundární strukturou. V této oblasti je lokalizováno vnitřní vazebné místo pro ribosom (IRES). Struktura IRES HCV je schopna přímo na sebe vázat 40S malou ribosomální podjednotku a eukaryotický iniciační faktor eIF3 bez pomoci dalších iniciačních faktorů a po sestavení kompletního 80S ribosomu zahájit translaci. Po celém světě je v současnosti HCV chronicky infikovaných kolem 150 milionů osob a ročně se u více jak 100 tisíc z nich rozvine hepatocelulární karcinom.

Možným terapeutickým přístupem je inhibice translace závislé na IRES HCV. Jako inhibitory funkce IRES HCV se uplatňují molekuly různé povahy. Z klinického hlediska jsou slibnou skupinou nízkomolekulární sloučeniny. Mechanismus jejich inhibičních schopností spočívá v navázání se na některou ze sekundárních nebo terciálních struktur HCV IRES a narušovat jejich strukturu nebo dynamiku. V první řadě se proto tato diplomová práce zabývá přípravou systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV v knihovně chemických sloučenin.

Ačkoliv je sekvence IRES HCV značně konzervovaná, dochází z různých důvodů k výskytu mutací v této oblasti genomu HCV. Takovéto mutace mohou výrazně ovlivnit míru translace a replikace viru v hostitelském organismu. Při izolaci IRES HCV ze vzorků od pacientů tak dostáváme soubor sekvencí obsahujících různé mutace. Jejich analýzou je možno určit, jak ovlivňují translaci závislou na IRES HCV. Lokalizací těchto mutací můžeme určit oblasti IRES HCV, které jsou nejvíce citlivé na výskyt mutací a ve kterých mutace způsobují nejvýznamnější narušení sekundární struktury IRES. Druhým tématem, kterému se tato práce věnuje, je tedy studium variability sekvencí IRES HCV izolovaných ze vzorků od pacientů. Navazuje tak na práci, které se věnoval člen laboratoře Anas Ahmad Kwahaja, M.Sc. Současně s tím se úpravou experimentálního uspořádání snaží vyřešit otázku, zda opravdu zpracování používaných vzorků od pacientů pomocí *Taq* polymerasy způsobuje umělé vnášení mutací do vzorků, či nikoliv.

Vlastní práce je členěna do dvou celků. Prvním je literární přehled, který se věnuje sekundární struktuře IRES HCV a inhibitorům translace závislé na IRES HCV. Zvláště detailně se věnuje především skupině nízkomolekulárních inhibitorů. Ve druhé části práce se nachází experimentální část popisující provedené experimenty a jejich výsledky.

## **2. Cíle práce**

---

Tato diplomová práce měla stanoveny dva hlavní cíle:

- 1) Příprava systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů translace závislé na vnitřním vazebném místě pro ribosom viru hepatitidy typu C a případná verifikace systému.**
- 2) Studium variability sekvencí vnitřního vazebného místa pro ribosom viru hepatitidy typu C izolovaných ze vzorků od pacientů a možné ovlivnění této variability experimentálním uspořádáním.**

### 3. Literární přehled

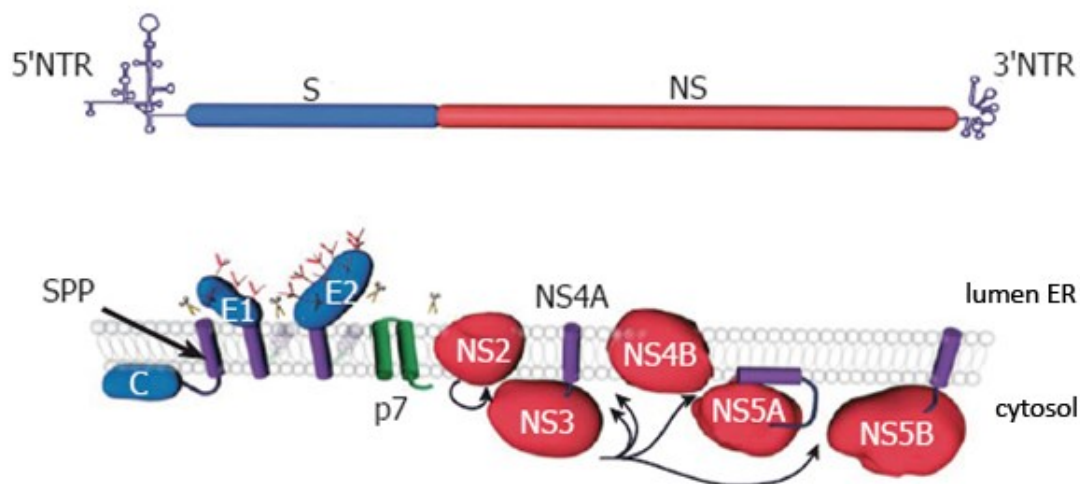
Hepatitida typu C, řazená původně do skupiny neidentifikovaných „non-A, non-B hepatid“ (NANBH), byla poprvé popsána roku 1975 u pacientů trpících posttransfusní hepatitidou (Feinstone a kol., 1975). Izolovat vlastní virus hepatitidy typu C (HCV) se však dlouho nedařilo vzhledem ke špatné propagaci viru v tehdy dostupných buněčných kulturách. Poprvé byl proto genom HCV získán a osekvenován až roku 1989 (Choo a kol., 1989).

HCV je obalený jednořetězcový RNA virus s pozitivním vláknem (+ssRNA virus, třída IV Baltimoreovy klasifikace), jenž náleží do rodu *Hepacivirus* spadajícího do čeledi *Flaviviridae* (Van Regenmortel a kol., 2000). Jeho 9,6 kb dlouhý genom, který je na obou koncích ohraničen vysoce strukturovanými netranslatovanými oblastmi (*nontranslated region*, NTR), kóduje přibližně 3010 aminokyselin (AK) dlouhý polyproteinový prekursor (viz Obrázek 3.1) (Choo a kol., 1991). Polyprotein je štěpen buněčnými a virovými proteasami za vzniku deseti proteinů: 4 strukturních (core, E1, E2 a p7) a 6 nestrukturních (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B) (Bartenschlager a kol., 2004; Moradpour a kol., 2007), jejichž hlavní funkce jsou stručně charakterizovány v Tabulce 3.1.

**Tab. 3.1.: Přehled proteinů kódovaných HCV.**

Molekulová hmotnost byla určena pomocí proteinové elektroforesy v prostředí SDS. Rozdílné hodnoty molekulových hmotností u proteinů E1 a NS5A jsou dány různými metodami exprese (vystřížení z polyproteinu, resp. exprese v bakteriích). (Upraveno podle Dubuisson, 2007).

Protein	Molekulová hmotnost [kDa]	Funkce
core	21	RNA vazebný protein; tvoří nukleokapsidu
E1	31-35	Obalový glykoprotein; asociovaný s E2
E2	70	Obalový glykoprotein; váže se na receptor
p7	7	Protein tvořící iontový kanál
NS2	21	Účastní se složení a uvolnění viru z buňky; štěpí prekursor NS2-NS3
NS3	69	N-koncová část s proteinasovou aktivitou; C-koncová část s NTPasovou/helikasovou aktivitou
NS4A	6	Kofaktor proteinasového komplexu NS3-4A
NS4B	27	Indukuje změny membrány
NS5A	56-58	Fosfoprotein; napomáhá replikaci virové RNA
NS5B	68	RNA dependentní RNA polymerasa



**Obr. 3.1.: Organizace genomu HCV a způsob štěpení polyproteinu na jednotlivé proteiny.**

**Nahoře:** Genom HCV obsahuje na obou koncích vysoce strukturované netranslatované úseky (NTR) a kóduje strukturní (S) a nestrukturní (NS) proteiny.

**Dole:** Všechny proteiny jsou translatovány společně v podobě polyproteinu, který je následně štěpen několika enzymy. Obrázek znázorňuje orientaci proteinů v rámci membrány endoplazmatického retikula a způsob vyštěpení z polyproteinu. Symboly nůžek značí štěpení hostitelskou signální peptidasou, šipky naznačují štěpení komplexů NS2-3 a NS3-4A pomocí jejich vlastních proteasových aktivit. Šipka směřující do membrány značí štěpení buněčným enzymem *signal peptide peptidase* (SPP). Topologie transmembránových domén glykoproteinů E1 a E2 před štěpením signální peptidasou je naznačená šedě.

(Upraveno podle Dubuisson, 2007)

### 3.1. Hepatitida C

Po celém světě je v současnosti HCV chronicky infikováno kolem 150 milionů osob a ročně se u více jak 100 tisíc z nich rozvine hepatocelulární karcinom (HCC) (data Světové zdravotnické organizace platná k 7/2012, *Fact sheet N°164*). Virus je šířen krví, sdílením jehel při injekčním užívání drog, z krevních transfúzí, krevních produktů či derivátů a v určité míře též při rizikovém sexuálním chování. Vertikální přenos z matky na dítě je sice dobře zdokumentovaný, ale není příliš častý a hrozí především v případech pacientek s vysokou hladinou virové RNA v krvi, nejčastěji při koinfekci HIV (*Human Immunodeficiency Virus*, virus lidské imunitní nedostatečnosti) (Conte a kol., 2000; Ceci a kol., 2001; Sy a Jamal, 2006). Z nakažených osob se spontánně vyléčí asi 20 %, zbylých 80 % je ohroženo následky chronické infekce, která často vede k steatose, cirhose a v určitém procentu případů i k rozvoji HCC.

Při léčbě hepatitidy C se obvykle používá tzv. duální terapie, tedy purinový analog ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboxamid) spolu s pegylovaným interferonem α-2a či α-2b, který je stabilnější oproti nemodifikované formě.



Obě sloučeniny jsou však toxické a mají četné vedlejší účinky, navíc je nutné užívat je minimálně 6 měsíců, případně déle (Sharma, 2010). Díky značné genetické heterogenitě je HCV klasifikován na sedm genotypů (označovaných 1 až 7) a více jak sto subtypů (označovaných malými písmeny latinky) (Simmonds a kol., 2005). Nejrozšířenější jsou genotypy 1, 2 a 3, přičemž jsou mezi nimi značné rozdíly v odpovědi na léčbu a klinickém profilu (Feld a Hoofnagle, 2005). Jednotlivé genotypy také podléhají geografické distribuci (Mellor a kol., 1995). Nejhorších výsledků je dosahováno při léčbě genotypů 1 a 4; u pacientů nakažených HCV-1 je úspěšnost léčby pouze 40-50 % (Sharma, 2010). V hostitelském organismu se navíc běžně vyskytuje současně několik částečně sekvenčně odlišných „variant“ HCV, označovaných jako kvazidruhy (angl. *quasispecies*), jejichž nukleotidové sekvence se liší v rozmezí 1-5 % (Martell a kol., 1992). Genetická rozmanitost a rychlost vzniku mutací odolných proti konkrétní léčbě tak představují značnou překážku ve vyvinutí léčby aplikovatelné na širokou škálu pacientů. Pokrokem oproti běžné duální léčbě jsou dnes již schválené přípravky, které pomáhají především s léčbou pacientů nakažených genotypem 1. Jedná se o inhibitory virové proteasy (obchodní názvy Boceprevir a Telaprevir) a inhibitor virové polymerasy (Tegobuvir) (Poordad a kol., 2011; Zeuzem a kol., 2011; Zeuzem a kol., 2012). Celá řada dalších preparátů je v současnosti v pokročilých stádiích klinických zkoušek (pro bližší informace viz přehledový článek Lange a Zeuzem, 2013).

### 3.2. Iniciace translace

Translace je proces přepisu genetické informace v podobě mRNA do primární struktury proteinu. První ze tří fází translace je iniciace, kdy dochází k sestavení funkčního ribosomu na molekule mRNA a začátku translace z iniciačního kodonu AUG. V eukaryotických buňkách převažuje tzv. iniciace translace závislá na čepičce; jedním z alternativních způsobů je iniciace translace závislá na vnitřním vazebném místě pro ribosom (*internal ribosome entry site*, IRES), který úspěšně využívá řada virů a v určité formě i některé buněčné mRNA (Martinez-Salas a kol., 2012; Jackson, 2013). Schématický přehled jednotlivých modelových typů iniciace translace je uveden na Obrázku 3.2.

#### 3.2.1. Iniciace translace závislá na čepičce

Typická eukaryotní molekula mRNA má na 5' konci navázanou methylguanosinovou strukturu [ $m^7G(5')ppp(5')N$ ] nazývanou čepička a na 3' konci dlouhou polyadenylovou strukturu označovanou jako poly(A) sekvence. Iniciace translace takovéto molekuly

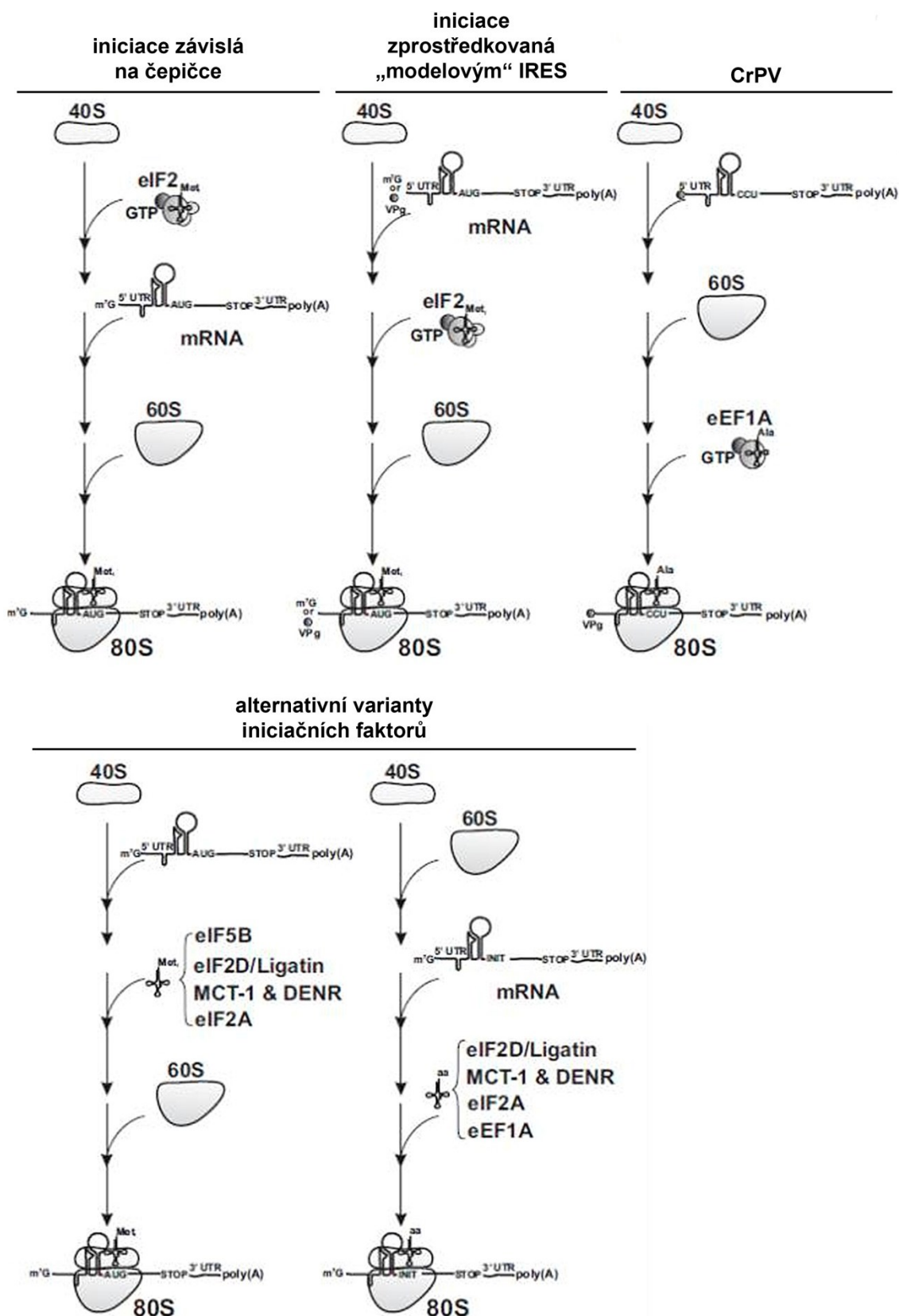
mRNA vyžaduje velký počet iniciačních faktorů označovaných jako eIF. Na čepičku se váže komplex eIF4F, který je současně v kontaktu s poly(A) vazebnými proteiny (*poly(A)-binding protein*, PABP), a umožňuje vazbu 43S preiniciačního komplexu. Ten je tvořen ternárním komplexem eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup>, malou 40S ribosomální podjednotkou a iniciačními faktory eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5. Takto vytvořený 48S preiniciační komplex je v tzv. otevřené konformaci a dochází k pročitání (skenování) mRNA ve směru 5' → 3' s cílem nalézt iniciační kodon ve vhodném kontextu okolní sekvence. Po jeho nalezení se komplex zastaví, dojde ke změně konformace ribosomální podjednotky v zavřenou a pomocí eIF5B je připojena velká ribosomální 60S podjednotka. Dojde k vytvoření kompletního eukaryotického 80S ribosomu a translace může postoupit do fáze elongace a následně terminace.

(Pro ucelený výklad iniciace translace a funkce jednotlivých eIF viz přehledové články Sonenberg a Hinnebusch, 2009; Jackson a kol., 2010; Valášek, 2012, neboť iniciace translace závislá na čepičce není předmětem této práce.)

### **3.2.2. Iniciace translace závislá na vnitřním vazebném místě pro ribosom**

Přestože bylo dlouho známo, že picornaviry jakožto +ssRNA viry v buňce potlačují translaci hostitelských mRNA a přitom exprimují vlastní genovou informaci, nebylo jasné, jak toho dosahují. Picornavirový genom obsahuje na 5' konci stovky nukleotidů dlouhý nepřekládaný úsek s bohatou sekundární strukturou a několika AUG kodony. Jejich genom je polyadenylovaný, ale neobsahuje čepičku. Až v roce 1988 dvě skupiny nezávisle na sobě zjistily, že tento 5' koncový úsek virového genomu, tzv. IRES, je schopen přímo vázat malou ribosomální podjednotku (Jang a kol., 1988; Pelletier a Sonenberg, 1988). Tři roky poté byl poprvé IRES popsán i u buněčné mRNA kódující chaperon BiP (*binding immunoglobulin protein*) lokalizovaný v lumen endoplasmatického retikula (Macejak a Sarnow, 1991). Od té doby byly popsány struktury IRES u mnoha virových i buněčných mRNA (Stoneley a Willis, 2004; Komar a Hatzoglou, 2005; Dounda a Sarnow, 2007). Výhodou iniciace translace závislé na IRES je potřeba menšího množství iniciačních faktorů; v některých případech je dokonce možno iniciovat translaci zcela bez jejich spoluúčasti (Lancaster a kol., 2006).

Ucelený přehled experimentálně ověřených buněčných a virových struktur IRES lze najít v databázi IRESite, která byla vytvořena naší laboratoří a která je dostupná na adrese <http://www.iresite.org> (Mokrejš a kol., 2006; Mokrejš a kol., 2010).



**Obr. 3.2.: Schématický přehled několika rozdílných modelů iniciace translace.**

Eukaryotní iniciace translace závislá na čepičce / iniciace translace prostřednictvím modelového IRES / iniciace translace viru paralýzy cvrčků (CrPV, *Cricket paralysis virus*) bez přítomnosti většiny buněčných iniciačních faktorů / iniciace translace za přítomnosti alternativních iniciačních faktorů.

(Upraveno podle Komar a kol., 2012)

### 3.3. Vnitřní vazebné místo pro ribosom HCV

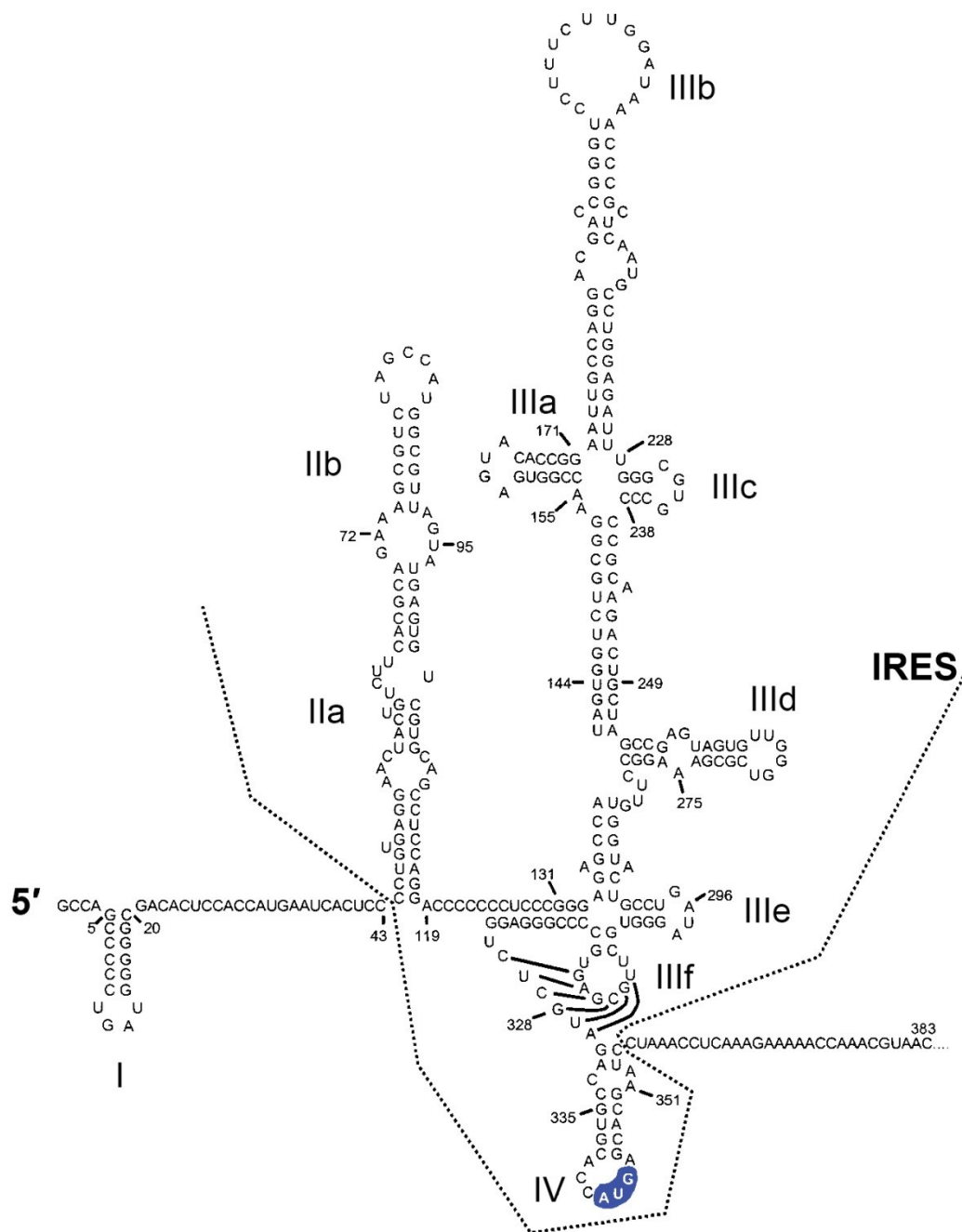
Skutečnost, že genom HCV obsahuje IRES a iniciace translace je tak na čepičce nezávislá, byla poprvé popsána roku 1992 na základě experimentů s bicistronickými konstrukty (Brown a kol., 1992; Tsukiyama-Kohara a kol., 1992). Struktura IRES byla determinována nukleasovým mapováním, genetickými a fylogenetickými analýzami i pomocí predikcí (Brown a kol., 1992; Honda a kol., 1996a; Sizova a kol., 1998; Honda a kol., 1999; Kolupaeva a kol., 2000). K iniciaci translace vyžaduje IRES HCV z iniciačních faktorů pouze eIF3 a faktor přinášející iniciátorovou Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (eIF2-GTP, eIF2D [ligatin] či eIF2A) (Dmitriev a kol., 2010; Skabkin a kol., 2010; Kim a kol., 2011), je tedy nezávislý na faktorech ze skupiny eIF4 (Pestova a kol., 1998).

#### 3.3.1. Sekundární struktury IRES HCV a jejich funkce

V 5' NTR HCV se vyskytují celkem čtyři domény s bohatou sekundární strukturou označované I až IV (Wang a kol., 1994; Honda a kol., 1996b). Doména I se ovšem translace neúčastní, naopak její míru snižuje (Rijnbrand a kol., 1996); účastní se ale spolu s doménou II replikace virové RNA (Friebe a kol., 2001). Oblast IRES je tedy tvořena doménami II až IV (Honda a kol., 1999), jak znázorňuje Obrázek 3.3. To představuje báze 40 až 372 virového genomu, což znamená, že IRES zasahuje i do otevřeného čtecího rámce, který začíná AUG kodonem v pozici 342 (Fukushi a kol., 1994; Reynolds a kol., 1995; Honda a kol., 1996b; Reynolds a kol., 1996).

**Doména II** je tedy první strukturou zajišťující správnou funkci IRES. Její struktura byla určena pomocí NMR spektroskopie (spektroskopie nukleární magnetické resonance) (Lukavsky a kol., 2003). Jedná se o dlouhou nevětvenou vlásenku s několika smyčkami (Zhao a Wimmer, 2001), která zaujímá tvar písmene L, a to jak volně v roztoku, tak po vazbě 40S ribosomální podjednotky (Spahn a kol., 2001; Kim a kol., 2002). K tomuto typickému ohnutí dochází v oblasti subdomény IIa díky patrovým interakcím bází -<sub>53</sub>AACUA<sub>57</sub>-, vysunutí báze U56 do prostoru a stabilizaci hořčnatými kationty (Dibrov a kol., 2007). Po navázání 40S ribosomální podjednotky na IRES HCV dochází k interakci subdomény IIb s ribosomálním proteinem S5, který se nachází ve výstupním kanálu pro mRNA (Spahn a kol., 2001), přičemž apikální část subdomény zasahuje až do E místa ribosomu a prostřednictvím interakcí s ribosomálními proteiny S14 a S16 mění konformaci 40S ribosomální podjednotky z otevřené na zavřenou (Kolupaeva a kol., 2000; Spahn a kol., 2001; Babaylova a kol., 2009). To je důležitý krok iniciace translace; tato změna je přitom při translaci zprostředkované čepičkou navozena interakcí iniciačních

faktorů eIF1A a eIF5 (Maag a kol., 2006). Apikální část subdomény IIb také pravděpodobně stabilizuje polohu domény IV pro vazbu ternárního komplexu na iniciační kodon (Filbin a Kieft, 2011).



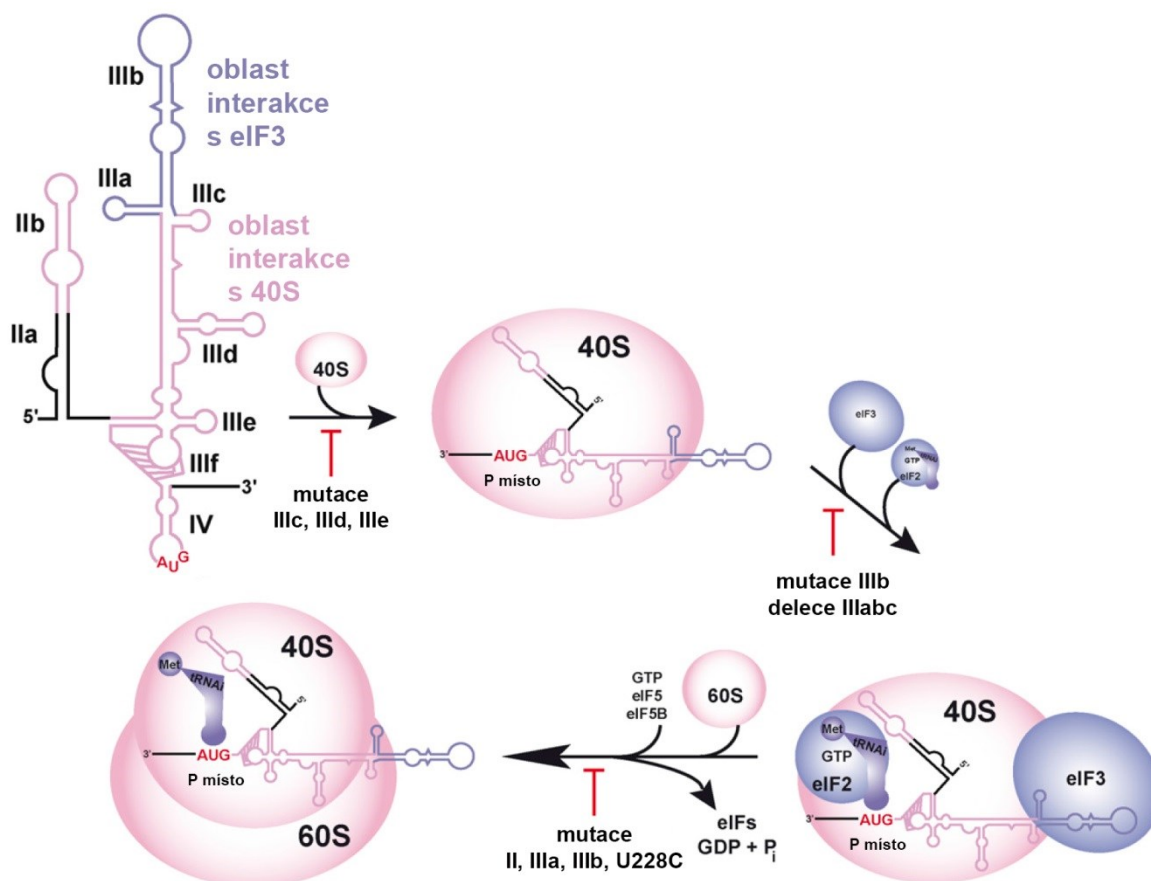
**Obr. 3.3.: Strukturní model 5' nepřekládané oblasti genomu HCV.**

Schématické znázornění sekundárních struktur v 5' nepřekládané oblasti. Domény I-IV jsou popsány s označením příslušných subdomén (malým písmenem za římskou číslovkou). Arabskými čísly jsou vyznačeny pozice daných bází vzhledem k 5' konci genomu. Vlastní vnitřní vazebné místo pro ribosom (IRES) je vymezeno tečkovaně. Iniciační kodon AUG v pozici 342 je vyznačen modře. Na 3' konec struktury IRES navazuje začátek otevřeného čtecího rámce kódujícího virový polyprotein.

(Upraveno podle Honda a kol., 1999)

**Doména III** je největší a složitě větvená struktura IRES HCV. Dělí se dále na 6 subdomén označovaných a až f. Hraje zásadní roli ve vazbě eIF3 (Ji a kol., 2004; Otto a Puglisi, 2004) a také 40S malé ribosomální podjednotky (Kieft a kol., 2001; Otto a Puglisi, 2004).

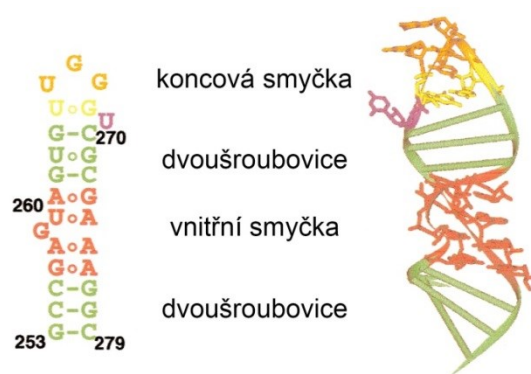
Apikální část domény III, tvořená subdoménami a až c, je obvykle označována souhrnně jako IIIabc a je tvořena křížovým spojením těchto tří subdomén. Toto křížové spojení je stabilizováno patrovými interakcemi tří nepárových bází, A154, A155 a U228, se subdoménami IIIa a IIIb (Kieft a kol., 2002), díky čemuž se je toto spojení schopno složit do dané konformace i za nižší koncentrace hořčnatých kationtů, než jaká by byla jinak potřebná (Melcher a kol., 2003). Důležitost spojení spočívá zejména v jeho poloze, neboť leží mezi oblastí, kam se váže eIF3, a oblastí vazby malé ribosomální podjednotky (viz Obrázek 3.4). Jednobodové mutace (především báze U228) tak mohou zásadně narušit tuto strukturu a mnohonásobně snížit schopnost IRES vázat zmíněné molekuly a iniciovat translaci (Kieft a kol., 2001).



**Obr. 3.4.: Subdomény IRES HCV a jejich interakce s 40S ribosomální podjednotkou a eukaryotickými iniciačními faktory (eIF).**

Na schématu IRES HCV jsou zobrazeny oblasti vazby eIF3 a 40S ribosomální podjednotky. Dále je pak naznačena posloupnost interakcí a změna geometrie IRES. Červenými šipkami s popisy jsou označeny příslušné mutace či delecce, které inhibují dané kroky iniciace translace. U228C značí mutaci uracilu v pozici 228 na cytosin. (Upraveno podle Lukavsky, 2009)

Subdoména III<sub>d</sub> zaujímá vlásenkovou strukturu s vnitřní smyčkou. V této smyčce se nachází tzv. SRL (*sarcin-ricin loop*) motiv, vyskytující se často v ribosomálních RNA a vyznačující se nekonvenčními vazbami mezi bázemi (Szewczak a Moore, 1995; Correll a kol., 1997). Výskyt tohoto strukturního motivu má za následek esovité zkroucení (tzv. *S-turn*) příslušného úseku řetězce. V rámci této subdomény však zaujímá obdobné esovité zkroucení také úsek koncové smyčky  ${}_{264}\text{UUGGGU}_{269}$ . Díky těmto dvěma zkroucením získává subdoména III<sub>d</sub> charakteristický strukturní rys, jak je znázorněno na Obrázku 3.5. Tvar subdomény III<sub>d</sub> je zřejmě esenciální pro vazbu 40S ribosomální podjednotky, neboť právě pro vazbu malé ribosomální podjednotky je subdoména III<sub>d</sub> nezbytná (Jubin a kol., 2000; Kolupaeva a kol., 2000; Babaylova a kol., 2009). Důležitý je z tohoto hlediska i samotný triplet  ${}_{266}\text{GGG}_{268}$ , který je vysoce konzervovaný mezi jednotlivými genotypy HCV a jeho pozměněním dochází k markantnímu snížení vazebné schopnosti a celkové funkce IRES (Kieft a kol., 1999; Jubin a kol., 2000; Kieft a kol., 2001). Rozdílem oproti ostatním doménám je schopnost samovolně se složit do správné konformace i bez přítomnosti dvojmocných kationtů (Klinck a kol., 2000).



**Obr. 3.5: Sekundární struktura subdomény III<sub>d</sub>.**

**Vlevo** je uvedena sekvence subdomény III<sub>d</sub> včetně způsobu párování bází – čárkou naznačené klasické párování bází *Watson-Crickovského* typu, kroužkem kolísavé (*wobble*) párování.

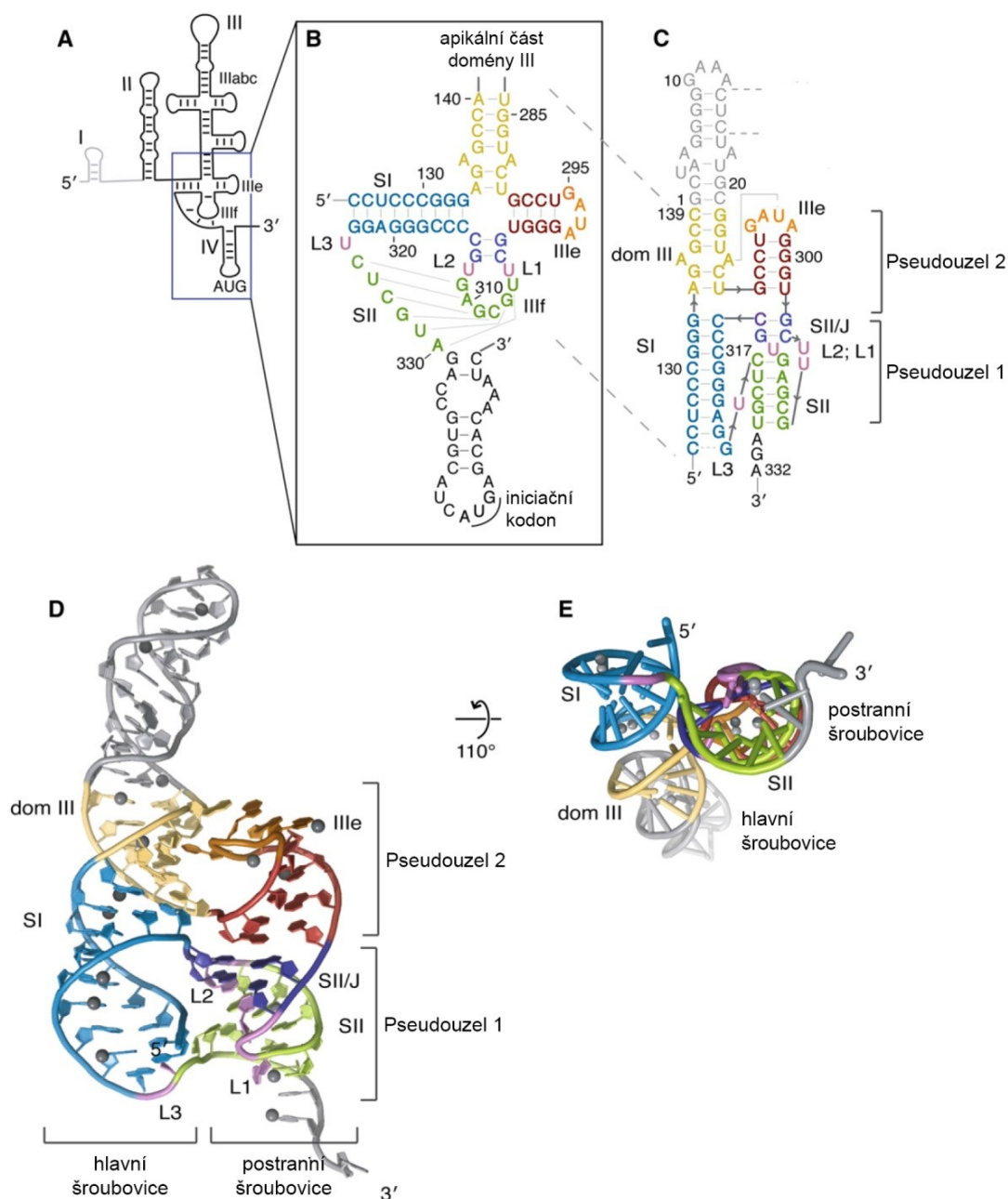
**Vpravo** je pak vyznačena sekundární struktura subdomény. Zelené úseky jsou tvořeny dvoušroubovicí A-formy, červeně je vyznačena vnitřní smyčka s SRL motivem, oranžově koncová smyčka a žlutě tzv. *trans-wobble* U○G pár.

(Upraveno podle Klinck a kol., 2000)

V basální části domény III se nacházejí subdomény e a f spoluvytvářející křížové spojení (Rijnbrand a Lemon, 2000). Subdoména IIIe obsahuje na konci smyčky sekvenci  $_{295}\text{GAUA}_{298}$ , která však oproti možnému očekávání netvoří tzv. *GNRA tetraloop* motiv, který je přítomný ve velkém počtu různých RNA molekul, především pak v ribozymech (Jucker a kol., 1996; Prathiba a Malathi, 2008). Tato čtyřnukleotidová sekvence má podle výsledků mutačních pokusů značný vliv na vazbu 40S ribosomální podjednotky (Kieft a kol., 2001). Důležitou vlastností subdomény IIIf je její účast v tvorbě tzv. dvojitého pseudouzlu (viz Obrázek 3.6). Jeho první rameno (SI, z angl. *steam*) je tvořeno prostřednictvím interakce šesti bází smyčky subdomény IIIf s bázemi 325-330. Druhé rameno (SII) vzniká díky interakci bází 125-133 mezi doménami II a III s bázemi 315-323 mezi doménami III a IV (Wang a kol., 1995; Kieft a kol., 2001; Berry a kol., 2010). Krom ramen jsou rozlišovány ještě hlavní a vedlejší šroubovice, tvořené bazální částí domény III a ramenem I (hlavní), respektive subdoménou IIIe a ramenem II (vedlejší). Oblast pseudouzlu může být štěpena lidskou RNasou P, což naznačuje, že její struktura zřejmě mimikuje strukturu tRNA (Nadal a kol., 2002). Většina mutací v subdoméně IIIf vedoucích k rozrušení struktury pseudouzlu narušovala funkci IRES, ale tyto měly pouze malý vliv na vazbu 40S ribosomální podjednotky (Kieft a kol., 2001). Na základě toho můžeme předpokládat, že hlavní úloha pseudouzlové struktury spočívá v umístění iniciačního kodonu do správné pozice vůči ribosomální podjednotce.

**Doména IV** obsahuje iniciační kodon a začátek otevřeného čtecího rámce polyproteinu. Je schopna zaujímat vlásenkovou strukturu, ale podoba této struktury je velmi dynamická a vlásenková struktura je relativně nestabilní (Kieft a kol., 1999). Vazba 40S ribosomální podjednotky zřejmě navozuje preferenční jednovláknovou formu tohoto úseku, dává mu specifickou podobu a umožňuje umístění iniciačního kodonu do P místa (Filbin a Kieft, 2011). Správné umístění iniciačního kodonu do dekodujícího žlábků 40S malé ribosomální podjednotky však pomáhají zajišťovat i doména II (Odreman-Macchioli a kol., 2001; Kalliampakou a kol., 2002) a pseudouzlová struktura (Berry a kol., 2010; Lavender a kol., 2010).



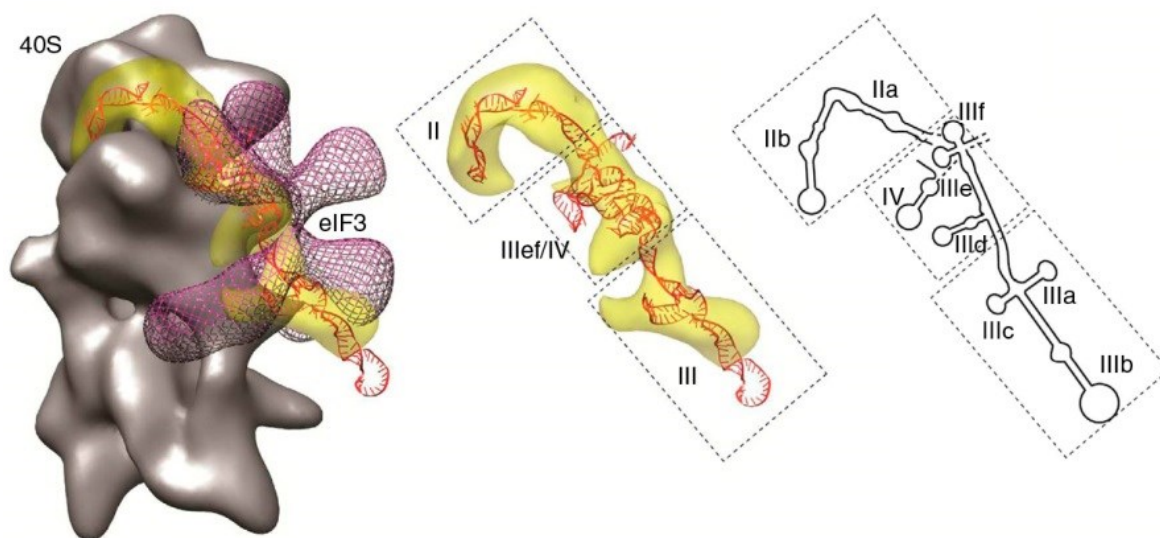


**Obr. 3.6.: Struktura dvojitého pseudouzlu v rámci IRES HCV.**

- (A) Schématické znázornění HCV IRES s popsanými doménami a vyznačenou oblastí tvořící strukturu dvojitého pseudouzlu.
- (B) Schématické znázornění sekundární struktury vyznačené v (A) včetně sekvence.
- (C) Sekundární struktura konstruktů použitého pro krystalografickou studii. Barevně označené nukleotidy odpovídají nukleotidům IRES HCV, šedě vyznačené nukleotidy 1-21 tzv. krystalizačního modulu nahrazují v tomto konstruktu doménu III.
- (D) Krystalová struktura konstruktů v rovině, jaká je naznačena na schématu (C) a (E) v rovině pootočené o  $110^\circ$  ve směru naznačeném symbolem.
- Nikelnaté kationty znázorněny jako šedé kuličky; SI a SII – první a druhé rameno (*steam*) pseudouzlu; L1-3 – smyčky (*loop*); na všech obrázcích žlutě doména III (dom III), světle modře SI, červeně subdoména IIIe, tmavě modře SII/J, zeleně SII, šedě krystalizační modul.
- (Upraveno podle Berry a kol., 2011)

### 3.3.2. Terciální struktura IRES HCV

Struktura IRES HCV zaujímá terciální strukturu za pomoci hořčičných iontů, které ji stabilizují díky stínění negativního náboje cukrfosfátové kostry RNA. Po vazbě ribosomu nebo eIF3 zaujímá IRES HCV tvar písmena J (viz Obrázek 3.7). Kratší strana je tvořena doménou II a jejím charakteristickým ohybem. Uprostřed je oblast pseudouzlu s vytrčenou doménou IV (Boehringer a kol., 2005). Následuje doména III, subdomény IIIe, IIIabc a na druhém konci strukturu ohraničuje subdoména IIIb.



**Obr. 3.7.: Terciální struktura IRES HCV po vazbě eIF3 a 40S ribosomální podjednotky.**

**Vlevo** je rekonstrukce preiniciačního komplexu podle dat získaných kryoelektronovou mikroskopií.

Šedě je znázorněna 40S ribosomální podjednotka, fialově eIF3, žlutě IRES HCV.

**Uprostřed** je znázorněna terciální struktura IRES HCV po navázání eIF3 a 40S r. podjednotky.

**Vpravo** je pak schematicky znázorněna geometrie jednotlivých subjednotek IRES HCV. Tečkované rámečky ohraničují základní strukturní prvky – doménu II, oblast pseudouzlu (doména IV a subdomény IIIe) a apikální část domény III (IIIabc).

(Upraveno podle Pérard a kol., 2013)

### 3.3.3. Podobnost IRES HCV s IRES dalších virů

Podobnou stavbu jako mají domény II – IV IRES HCV vykazují též IRES dalších virů z čeledi *Flaviviridae*, jako je virus klasického prasečího moru (*classical swine fever virus*, CSFV), virus BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) či GB virus B (GBV-B) (Pestova a kol., 1998; Honda a kol., 1999; Pestova a Hellen, 1999).

U některých virů z čeledi *Picornaviridae* byly nalezeny IRES, jejichž sekundární struktura je do značné míry podobná struktuře IRES HCV. Jedná se například o virus PTV (*porcine teschovirus*), virus ptačí encefalitidy (*avian encephalitis virus*, AEV) či opičí picornavirus (*simian Picornavirus*, SPV) (Pisarev a kol., 2004; Hellen a De Breyne, 2007;

Bakhshesh a kol., 2008). Rovněž pestivirové IRES je do značné míry podobné IRES HCV, avšak pouze strukturně, nikoliv sekvenčně (Brown a kol., 1992).

### 3.4. Inhibitory IRES HCV

Jak bylo ukázáno výše, IRES je pro HCV esenciální strukturou, jejíž funkčnost závisí na zachování primární a sekundární struktury jednotlivých domén. Pokud se chceme snažit inhibovat funkci IRES, můžeme zvolit několik přístupů, které znemožní vazbu iniciačních faktorů a ribosomální podjednotky a jejich potřebnou modulaci pro zdárný průběh iniciace translace. Různé přístupy, jak toho dosáhnout, jsou popsány dále s důrazem na chemické inhibitory, které jsou pro tuto práci nejdůležitější.

#### 3.4.1. Inhibice pomocí oligonukleotidů

Ve struktuře IRES HCV bylo různými skupinami vybráno několik cílových míst (např. doména IV včetně v ní obsaženého iniciačního kodonu či subdoména IIId), ke kterým byly vytvořeny komplementární fosforothioátové oligodeoxynukleotidy (Alt a kol., 1995; Zhang a kol., 1999; Tallet-Lopez a kol., 2003). Fosforotioáty jsou analogy DNA, ve kterých je jeden nevazebný kyslík fosfátové skupiny nahrazen atomem síry. Díky sulfurizaci vazby mezi nukleotidy se tyto molekuly vyznačují značnou odolností proti endo- i exonukleasové aktivitě různých buněčných a sérových enzymů. Navíc je díky této substituci usnadněn i průchod molekul přes lipidickou dvojvrstvu buněk (Connolly a kol., 1984; Spitzer a Eckstein, 1988; Reed a kol., 1990). První komerční oligonukleotidový inhibitor komplementární k doméně IV se sice ukázal jako funkční při laboratorních testech (Zhang a kol., 1999), avšak po první fázi klinických testů nebyla prokázána jeho účinnost (Mchutchison a kol., 2006). Nutno zmínit pro klinické využití značně pozitivní vlastnost komplementárních oligonukleotidů a to, že pro dosažení 50% inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) dostačují jejich velmi nízké koncentrace. Ty se při lipofekci buněčné kultury pohybují pouze v nanomolárních hodnotách (Davis a Seth, 2011).

Lepších výsledků co se vazby na cílovou molekulu týče bylo dosaženo při začlenění modifikovaných nukleotidů, jako například 2'-O-methyloligoribonukleotidů, které jsou při tvorbě RNA-RNA duplexů termostabilnější než odpovídající RNA-DNA duplexy a jsou odolné vůči štěpení RNasami a DNasami. Osvědčilo se rovněž použití LNA (*locked nucleic acid*; nukleová kyselina obsahující modifikovanou ribosu s můstkem mezi 2' kyslíkem a 4' uhlíkem, což zvyšuje teplotu tání takového biopolymeru) (Tallet-Lopez a kol., 2003; Nulfr a Corey, 2004). Také byla prokázána schopnost inhibice IRES HCV

prostřednictvím PNA (*peptide nucleic acid*; umělý biopolymer, ve kterém je cukr-fosfátová kostra nahrazena N-(2-aminoethyl)-glycinovým polymerem spojeným peptidovou vazbou a báze jsou k němu připojeny přes methylenový můstek a karbonylovou skupinu) (Nulf a Corey, 2004; Alotte a kol., 2008).

Do této kategorie inhibitorů se dají zařadit i deoxyribozomy. Jedná se o DNA molekuly mající enzymatickou aktivitu. Ve studii kterou publikovali Roy a kolektiv (2008) bylo ukázáno, že je možno jistou měrou inhibovat IRES HCV pomocí vložení krátké vlásenky, právě prostřednictvím deoxyribozymu, a to nejlépe do domény III. Tento jejich deoxyribozym se však ukázal být účinný pouze při použití genotypu HCV-1a, zatímco na jiné genotypy, např. HCV-1b, neměl žádný inhibiční vliv. Na základě tohoto zjištění lze usuzovat, že je důležitá sekvence cílového místa v rámci IRES HCV, nikoliv jeho struktura. Používané koncentrace inhibitorů se přitom pohybovaly v mikromolárních hodnotách. I přes to jsou ale deoxyribosomy zajímavé i vzhledem k jejich jednoduché syntéze, odolnosti vůči štěpení a díky jejich značné schopnosti vstupovat do buňky (Davis a Seth, 2011).

Ribozomy jsou molekuly RNA s enzymatickou aktivitou, avšak na rozdíl od deoxyribozymů cílové místo specificky štěpí. Tímto způsobem by bylo možno rozštěpit IRES HCV a zcela znemožnit translaci a replikaci HCV. Specifita ribozymu pro konkrétní místo je přitom snadno ovlivnitelná změnou párující sekvence vazebného místa substrátu. Molekula známá pod komerčním názvem Hepatozyme sice vykazovala dobrou selektivitu a účinnou inhibiční schopnost při pokusech na buněčných kulturách, ale při pozdějších klinických testech ve fázi II vykazovala účinnost nižší než 10 % a z dalšího testování byla stažena (Tong a kol., 2002).

### **3.4.2. Inhibice pomocí aptamerů a kompetitivních inhibitorů**

Aptamery jsou krátké oligonukleotidy nebo peptidy, které mají schopnost specifické vazby na cílovou molekulu. Aptamery jsou připravovány pomocí metody zvané SELEX (z angl. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), jejíž princip popsali nezávisle na sobě Ellington a Szostak (1990) a Tuerk a Gold (1990). Tato metoda je též někdy označována jako selekce *in vitro* či evoluce *in vitro*. Jsou pomocí ní cyklicky vybírány takové molekuly, které mají vyšší afinitu k cílové molekule. Použití aptamerů jakožto inhibitorů IRES HCV popsali ve svých člancích Cristina Romero-López a kolektiv (2005; 2007; 2009; 2012), ve kterých byly navrženy aptamery cílené proti doméně IV v oblasti iniciačního kodonu, proti subdoméně III<sub>f</sub> tvořící pseudouzel a proti subdoméně III<sub>d</sub>, která váže malou ribosomální podjednotku. Tyto molekuly byly složeny ze dvou částí

a to sice z části obsahující motiv rozpoznávající příslušnou vlásenku a z části obsahující motiv *hammerhead* ribozymu, díky kterému měla molekula cílové místo IRES HCV rozštěpit. Tyto molekuly byly při pokusech s buněčnými liniemi velmi úspěšné a koncentrace pro dosažení  $IC_{50}$  se pohybovaly v řádech  $\mu M$  až  $nM$ . Podobné pokusy provedly i další skupiny jako Kikuchi a kol. (2003; 2005; 2009) či Da Rocha Gomes a kol. (2004), jejichž aptamery byly cíleny proti různým místům IRES HCV a které vykazovaly inhibiční schopnosti i při velmi nízkých koncentracích. Jejich reálné terapeutické použití však zůstává nevyřešené (Davis a Seth, 2011). Zpočátku slibné výsledky na poli peptidových aptamerů inhibujících funkci IRES HCV autorské dvojice Litovchick a Szostak (2008) byly však nakonec odvolány, neboť se je nepodařilo zopakovat (Litovchick a Szostak, 2009).

Další možností je použití kompetitivních inhibitorů (v angl. literatuře označovaných jako *decoy*, návnada), které napodobují funkčně důležité oblasti IRES HCV jako jsou například domény III či IV. Díky tomu v buňce kompetují o IRES-vazebné proteiny, ribosomální proteiny a celé ribosomy a tím inhibují translaci zprostředkovanou IRES. Jako vhodné se pro tento účel ukázaly analogy subdomén IIIe a IIIf, které váží ribosomální protein S5, inhibující translaci při koncentracích potřebných pro dosažení  $IC_{50}$  kolem  $0,6 \mu M$  (Ray a Das, 2004). Tato inhibice je navíc IRES-specifická a neovlivňuje iniciaci translace zprostředkovanou čepičkou, neboť s tou S5 přímo neinteraguje, zatímco s IRES HCV ano (Westermann a Nygard, 1984; Laletina a kol., 2006).

### 3.4.3. Inhibice pomocí nízkomolekulárních látek

Pokud se zamýšlíme nad způsoby inhibice translace závislé na IRES, je nutné zvážit vlastnosti nízkomolekulárních sloučenin. Molekula RNA může jako cíl vazby takového typu inhibitoru sloužit velice dobře, což lze demonstrovat na příkladu bakteriálního ribosomu. Na jeho velkou i malou podjednotku se váže řada antibiotik, které interagují právě s molekulami ribosomálních RNA (Brodersen a kol., 2000; Vicens a Westhof, 2003; Steitz, 2008). Nízkomolekulární sloučenina, která by specificky inhibovala funkci IRES HCV, by pak mohla být teoreticky použita jako lék proti HCV. Její podání pacientům by bylo mnohem jednodušší, než je tomu v případě aptamerů nebo komplementárních oligonukleotidů. Požadavky na takovou sloučeninu jsou však značné: musí selektivně inhibovat pouze translaci závislou na IRES, nesmí být pro organismus pacienta toxická, pokud možno by neměla mít žádné vedlejší účinky, potřebné koncentrace by měly být co nejnižší a v neposlední řadě by měla rozpoznávat cílové místo svého působení na základě struktury, nikoliv sekvence. Ačkoliv míra mutací v rámci genomu HCV

je značná, v oblasti IRES k nim dochází s mnohem nižší frekvencí (Choo a kol., 1991). I přesto však existují sekvenční rozdíly v oblasti IRES mezi jednotlivými genotypy a dokonce mezi jednotlivými subtypy HCV. Můžeme si tak odvodit, že pokud by nebyla splněna poslední podmínka, tedy rozpoznání cílového místa na základě struktury, mohla by tato molekula působit pouze na určité genotypy či subtypy HCV a pokud by byl virus vystaven selekčnímu tlaku v organismu pacienta užívajícího tento lék, mohlo by docházet k mutacím právě v cílovém místě. To by opět vedlo ke vzniku variant HCV odolným k takovému léku.

Vzhledem k malým rozměrům takových nízkomolekulárních sloučenin není příliš pravděpodobné, že by byly tyto schopny inhibovat např. vazbu ribosomální podjednotky přímým bráněním v interakci s IRES HCV. Pravděpodobnější mechanismus jejich inhibičních schopností zřejmě tkví ve změně struktury či dynamiky IRES.

Jak už bylo zmíněno v Kapitole 3.1, v současné době jsou již schváleny některé nízkomolekulární látky použitelné jako léky proti HCV, které fungují na principu inhibice virové polymerasy či proteasy. Přestože byla nalezena řada sloučenin, které jsou schopny inhibovat funkci IRES HCV, do klinické praxe se zatím nedostala žádná z nich. Jelikož je jedním z cílů této práce příprava a případná verifikace systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV, budu se těmto sloučeninám věnovat podrobněji v následujících kapitolách.

#### **3.4.3.1. Vitamin B<sub>12</sub>**

Pod souhrnným názvem vitamin B<sub>12</sub> (kobalamin) je možno najít několik chemicky částečně odlišných sloučenin, tzv. provitaminů. V souvislosti s lidským organismem hovoříme o provitamínech kyanokobalaminu, hydroxykobalaminu, adenosylkobalaminu a methylkobalaminu. Jejich společným základem je korrinové jádro, které je podobné porfínovému, ale odlišuje se od něj absencí jednoho methinového můstku mezi pyrrolovými jádry a tím, že obsahuje namísto centrálně vázaného železa nebo chromu atom kobaltu. Vitamin B<sub>12</sub> se v buňkách podílí na syntéze ATP, DNA či mastných kyselin a je potřebný pro správnou krvetvorbu či funkci nervového systému (Kapadia, 1995; Clarke, 2008).

Kobalamin se stal potenciálním inhibitorem IRES HCV díky studii, ve které bylo ukázáno, že aptamer vázající kyanokobalamin obsahuje sekundární strukturu pseudouzlu (Lorsch a Szostak, 1994) a jak bylo popsáno v Kapitole 3.3.1., strukturu pseudouzlu obsahuje i IRES HCV. Později byl inhibiční účinek na IRES HCV skutečně potvrzen. Iniclace translace HCV byla pomocí kyanokobalaminu snížena zhruba o 60 %.

Jednalo se navíc o specifickou inhibici translace závislé na IRES HCV; translaci závislou na čepičce ovlivňoval kyanokobalamin až ve velmi vysokých koncentracích a to zřejmě nesespecifickým mechanismem (Lott a kol., 2001). Ovlivněna však nebyla ani translace arteficiálních konstruktů obsahující struktury IRES virů CSFV a EMCV, které jsou podobné IRES HCV (viz Kapitola 3.3.3) (Lott a kol., 2001). Zodpovědnou za tuto inhibici se ukázala doména IV IRES HCV. Pokud byl totiž vytvořen konstrukt, kdy byla doména IV IRES CSFV nahrazena doménou IV IRES HCV, stal se tento chimerický IRES citlivým ke kyanokobalaminu, přestože původní IRES CSFV k němu citlivý není (Li a kol., 2004).

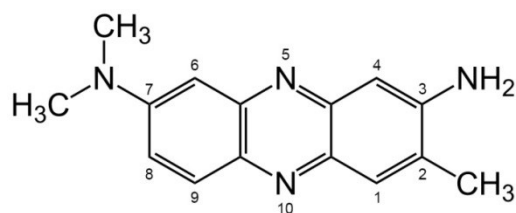
Byl též popsán základní princip inhibičního účinku kobalaminu. V přítomnosti kyanokobalaminu sice dojde ke složení kompletního 80S ribosomu s iniciačním kodonem lokalizovaným v P místě, ale již nedochází k posunu ribosomu dále po směru translace a ten je tak vázán v iniciační oblasti IRES HCV (Takayar a kol., 2002). Důvod, proč tomu tak je, však není znám. Jedna z hypotéz předpokládá, že HCV využívá vitamin B<sub>12</sub> jako regulátor vlastní replikace a translace. Zastavení translace polyproteinu HCV by poskytlo prostor pro replikaci virového genomu. Tuto hypotézu podporuje jak skutečnost, že vitamin B<sub>12</sub> je v lidském organismu skladován v játrech, tak fakt, že byl popsán vztah mezi koncentrací kobalaminu a virovou náloží. Závislost logaritmu virové nálože na koncentraci sérového kobalaminu má sigmoidální průběh s ostrým přechodem mezi hodnotami 150 pM a 250 pM. V tomto intervalu dochází k prudkému nárůstu o dvě jednotky, tedy ke stonásobnému zvýšení virové nálože (Lott a kol., 2001). V jiné studii byl vysloven předpoklad, že vitamin B<sub>12</sub> spolu s *core* proteinem inhibují translaci HCV za účelem navození stavu persistence v hepatocytech (Li a kol., 2004). Další navržený mechanismus inhibice HCV prostřednictvím kobalaminu byl založen na zjištění, že strukturní proteiny HCV se vážou na asialoglykoproteinový receptor (ASGP-R) a zřejmě jsou spolu s ním i internalizovány do buněk za přispění virového proteinu p7, přičemž je vazba viru na receptor inhibována jeho přirozenými ligandy (Saunier a kol., 2003). Tento receptor však zprostředkovává i vazbu kobalaminu a jeho transport do hepatocytů (Seetharam a Yammani, 2003), čímž by mohl vitamin B<sub>12</sub> inhibovat vstup viru do buňky.

Klinické studie vlivu užívání vitaminu B<sub>12</sub> u pacientů s chronickou hepatitidou C zatím nebyly v dostatečné míře zpracovány. V retrospektivní studii byl zkoumán vztah mezi hladinou vitaminu B<sub>12</sub> v séru (s-B<sub>12</sub>) a odpovědí na léčbu pacientů s hepatitidou C. Bylo zjištěno, že pacienti kteří, měli hladinu kobalaminu v séru vyšší, vykazovali zpočátku lepší klinickou odpověď na klasickou duální léčbu interferonem a ribavirinem (Rosenberg

a Hagen, 2011). V první skupině pacientů s počáteční koncentrací s-B<sub>12</sub> vyšší než 360 pM došlo u 96 % z nich ke snížení množství viru v organismu po ukončení léčby pod detekční mez. Takovýto pokles množství viru byl u druhé skupiny pacientů s počáteční koncentrací s-B<sub>12</sub> pod 360 pM pozorován pouze u 68 % z nich. V dlouhodobém měřítku však zůstal virus pod detekční hranicí pouze u 65 % pacientů z první skupiny, respektive u 52 % pacientů z druhé skupiny. Tento negativní trend může být uměle vytvořen nedostatečným počtem pacientů ve zkoumaném souboru (n = 99). Bylo ale také zjištěno, že v důsledku duální léčby dochází se snižování koncentrace s-B<sub>12</sub>, což by samozřejmě mělo za následek právě horší prognózu pro další vývoj stavu chronicky nemocných pacientů (Rosenberg a Hagen, 2011).

### 3.4.3.2. Fenazinové deriváty

Roku 2000 byla publikována studie, jejíž autoři prohledáním rozsáhlé knihovny náhodně syntetizovaných chemických sloučenin a extraktů z hub identifikovali schopnost inhibovat translaci závislou na IRES HCV u derivátu fenazinu. Jednalo se o molekulu, která je v podobě hydrochloridu známa jako *neutral red*, jejíž strukturní vzorec znázorňuje Obrázek 3.8 a chemický název je 3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazin (Wang a kol., 2000). Jedná se o planární molekulu, která může utvářet několik vodíkových vazeb díky dusíkovým heteroatomům a aminosubstitucím. Jako slibný základ pro tvorbu dalších derivátů se zdála být údajná vysoká specifická inhibiční schopnost vůči IRES HCV a nízká toxicita v rámci buněčných kultur. Ve výše zmíněné studii bylo popsáno vytvoření řady derivátů s množstvím modifikací funkčních skupin, byl rozrušen centrální heterocyklus, či měněna jeho velikost. Ve všech případech však došlo k zhoršení inhibičních schopností takovýchto derivátů o minimálně dva řády, k poklesu specifity ke struktuře IRES HCV a u některých sloučenin i k nárůstu toxicity (Wang a kol., 2000). Žádná další studie této skupiny chemických inhibitorů IRES HCV již nebyla publikována a tak zůstává otázkou, zda vůbec původní molekula přímo ovlivňovala IRES.

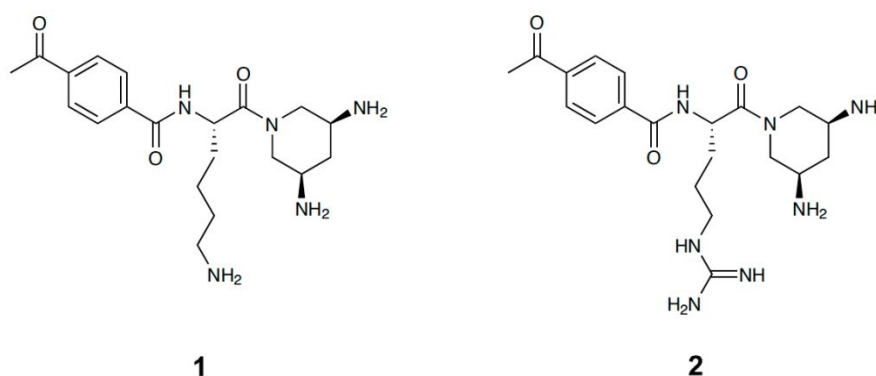


**Obr. 3.8.: Strukturní vzorec 3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazinu.**  
Derivát fenazinu, který byl popsán jako inhibitor translace závislé na IRES HCV.  
(vlastní ilustrace)



### 3.4.3.3. Inhibitory aminoglykosidového typu

Inspirací pro tuto skupinu inhibitorů IRES HCV se stala aminoglykosidová antibiotika vázající se na RNA. Molekuly těchto antibiotik jsou často vystavěny na základě 2-deoxystreptaminu (2-DOS). To je sloučenina obsahující několik atomů, které mohou fungovat jako donory při tvorbě vodíkových vazeb a navíc dvě aminoskupiny v konfiguraci cis-1,3, které zajišťují selektivní interakci se strukturními motivy RNA (Busscher a kol., 2005). Podle tohoto vzoru byla navržena heterocyklická sloučenina 3,5-diaminopiperidin (DAP), napodobující strukturu farmakoforu 2-DOS (Zhou a kol., 2007). Na základě DAP byla vytvořena řada molekul s cílem nalézt takové, které by se vázaly na IRES HCV a inhibovaly jeho funkci. Jednou ze skupin byly konjugáty DAP s N-amidy  $\alpha$ -aminokyselin (viz Obrázek 3.9) (Carnevali a kol., 2010).



**Obr. 3.9.: Strukturní vzorce inhibitorů IRES HCV založených na diaminopiperidinu.**

Deriváty diaminopiperidinu založené na aminokyselinách lysinu (**1**), resp. argininu (**2**).

(Upraveno podle Davis a Seth, 2011)

Tyto deriváty DAP byly poté testovány pomocí 2-aminopurinem fluorescenčně značené subdomény IIa. Tato fluorescenční molekula byla vložena do subdomény IIa namísto nukleotidu A54, neboť v této poloze identifikuje fluorescenční značka jak změny ve vázání hořečnatých kationtů, tak změny v geometrii IRES HCV. Na základě poklesu fluorescence tak bylo prokázáno, že se jsou na ni tyto deriváty schopny vázat a stabilizovat tak polohu domény II v jejím charakteristickém ohnutí do tvaru písmene L. Další ověření účinnosti těchto inhibitorů bylo provedeno pomocí metody FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*; metoda neradioaktivního přenosu energie mezi dvěma chromofory). Ukázalo se však, že zřejmě nedochází ke změnám v geometrii IRES HCV. Rovněž se prokázalo, že inhibiční schopnost derivátů DAP je silně ovlivněna koncentrací kladně nabitých iontů. Zatímco při 100  $\mu\text{M}$  koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  (koncentrace, při které se *in vitro* skládá sekundární struktura IRES HCV) se tyto molekuly vázaly na RNA velice dobře, se zvýšením koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  na 1 mM se jejich afinita k RNA snížila zhruba desetkrát a ještě dále

klesla se zvyšující se koncentrací  $\text{Na}^+$  (Carnevali a kol., 2010). Vazba těchto derivátů DAP na RNA je tak zřejmě zprostředkována elektrostatickými silami. Navíc se zdá, že molekuly DAP inhibitorů kompetují o vazbu na IRES HCV s  $\text{Mg}^{2+}$  ionty, které jak již bylo zmíněno slouží ke správnému složení sekundární struktury RNA (Carnevali a kol., 2010).

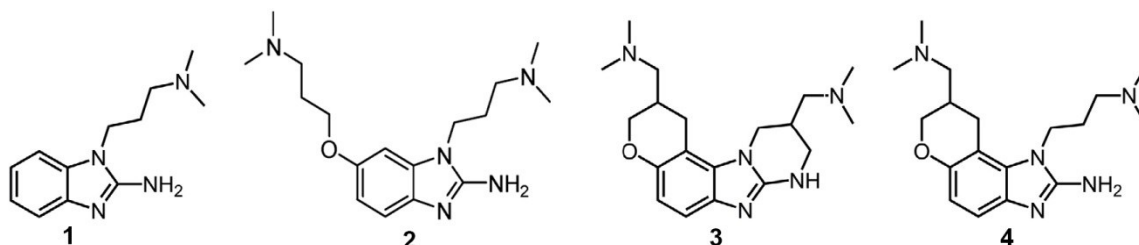
#### 3.4.3.4. Benzimidazolové deriváty

Bezimidazolové deriváty se začaly ve spojitosti s HCV nejdříve používat jako slibné inhibitory virové polymerasy NS5B (Tomei a kol., 2003; Beaulieu a kol., 2004; Patil a kol., 2012). Skutečnost, že benzimidazolové deriváty jsou schopny inhibovat HCV i jiným způsobem, a to prostřednictvím vazby na IRES HCV, byla prokázána prohledáním knihovny o počtu 180 tisíc chemických látek za pomoci hmotnostní spektrometrie (Seth a kol., 2005). Autoři studie ze společnost Ibis Therapeutics použili pro studium vazebné schopnosti molekul 29nukleotidový RNA konstrukt, který sloužil jako sekvenční a strukturní model subdomény IIa IRES HCV. Na základě první nalezené molekuly schopné vázat se na tento konstrukt (Obrázek 3.10-1) bylo společností Ibis Therapeutics vytvořeno kolem 150 nejrozumnějších derivátů, jejichž obecná struktura byla patentována (patent US8207173) (Seth a kol., 2005).

Až na několik výjimek vykazovala většina derivátů původní molekuly mnohem horší afinitu k modelovému RNA konstruktu a nižší selektivitu vazby. Zlepšení přineslo vnesení 3-(dimethylamino)propyloxylového postranního řetězce na atom C6 (Obrázek 3.10-2), čímž se desetinásobně zlepšila afinita a pětinasobně zvýšila selektivita pro výše zmíněný použitý 29nukleotidový RNA konstrukt. Další rapidní zlepšení přineslo zafixování postranních řetězců vázaných na atomech N1 a C6 (Obrázek 3.10-3 a 3.10-4), čímž došlo k zvýšení rigidity celé molekuly a k omezení konformačních stavů daných postranních řetězců. To mělo za následek více jak 25násobné zvýšení vazebné afinity molekuly inhibitoru k výše zmíněnému modelu domény IIa. Tyto molekuly vzniklé úpravou benzimidazolového jádra se nazývají dihydropyranobenzimidazoly. Zpočátku byla sice jejich syntéza značně obtížná a měla nízkou výtěžnost, ale následně byly navrženy postupy umožňující připravit dihydropyranobenzimidazolové inhibitory HCV IRES snadněji a lépe je oddělit od meziproductů (Parker a kol., 2011). Přehled nejdůležitějších modifikací a jejich vlivu na afinitu vazby na IRES HCV je znázorněn na Obrázku 3.11.

V době, kdy P. Seth a jeho kolegové (2005) pracovali na těchto benzimidazolových derivátech, publikovali P. Lukavsky a kolektiv (2003) strukturu domény II IRES HCV určenou za pomoci NMR. Tato struktura se lišila od dříve popsané (Honda a kol., 1999; Kieft a kol., 1999), ze které vycházeli i Seth a kolektiv (2005) při návrhu jejich

29nukleotidového RNA konstrukt sloužícího jako model části této domény. Museli tak vytvořit nový RNA konstrukt čítající 40 nukleotidů, který odrážel nově popsanou charakteristickou strukturu subdomény IIa. Deriváty 2-4 znázorněné na Obrázku 3.10 však při pokusech s tímto novým konstruktem vykazovali dokonce lepší vazebnou afinitu (Seth a kol., 2005).



**Obr. 3.10: Přehled strukturních vzorců nejdůležitějších derivátů benzimidazolových a dihydropyranobenzimidazolových inhibitorů IRES HCV.**

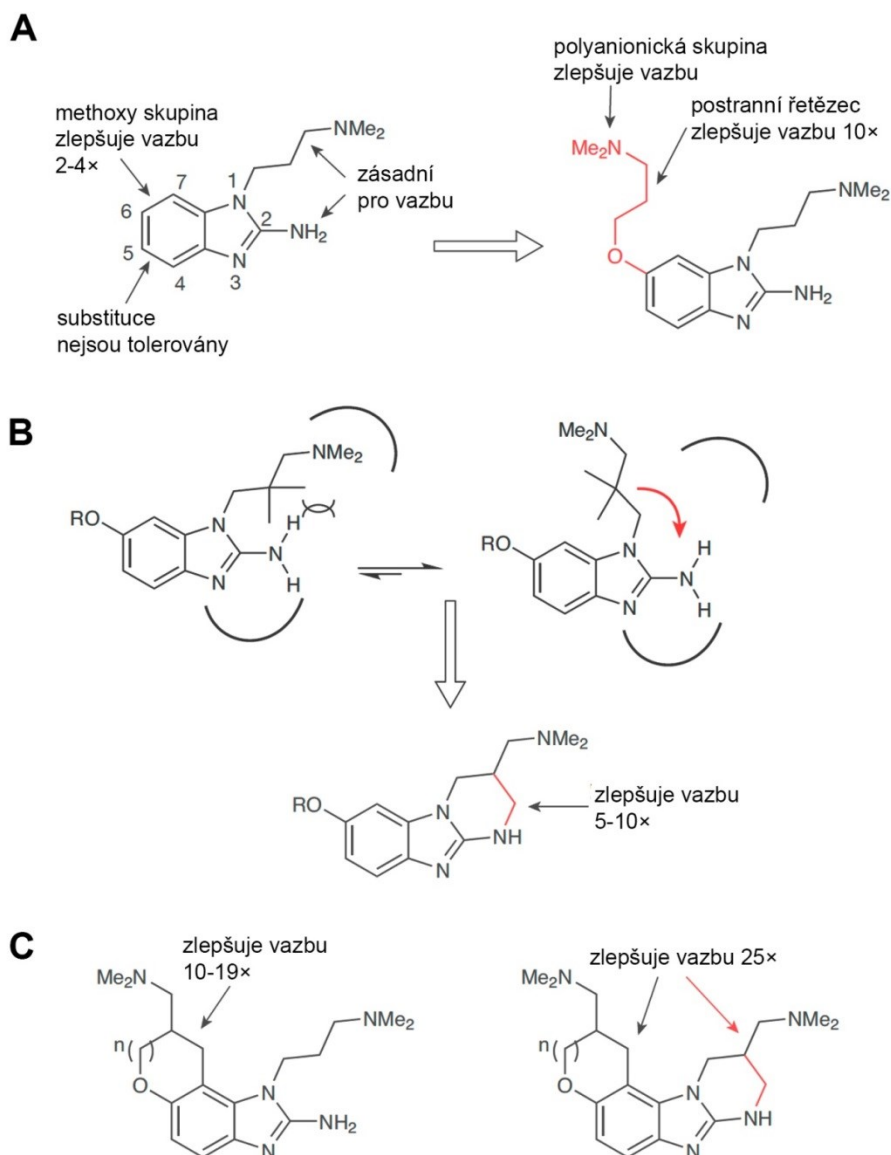
- (1) První benzimidazolový derivát, u kterého byla prokázána schopnost vazby na IRES HCV.
- (2) Připojený 3-(dimethylamino)propyloxylový postranní řetězec na atom C6 způsobuje zvýšení vazebné afinity a selektivity.
- (3) a (4) Dihydropyranobenzimidazolové deriváty, u kterých byl modifikací omezen počet konformačních stavů postranních řetězců, což vedlo k rapidnímu nárůstu vazebných schopností.

(Převzato z Zhou a kol., 2013)

Pomocí metody tzv. *RNA footprintingu*, která spočívá v porovnání míst štěpení RNasou samotné molekuly RNA a molekuly RNA s navázaným ligandem, bylo zjištěno, že výše popsané benzimidazolové inhibitory IRES HCV se cíleně váží do vnitřní smyčky subdomény IIa (Seth a kol., 2005). Konformační změny domény II IRES HCV indukované benzimidazolovými inhibitory byly potvrzeny záměnou nukleotidu A54 za fluorescenční značku 2-aminopurin a metodou FRET. Účinnost inhibice translace závislé na IRES HCV byla navíc s úspěchem testována v buňkách transientně i stabilně transfekovaných replikonem HCV (Parsons a kol., 2009).

Hrubou představu o tom, jak přesně vypadá doména II IRES HCV po navázání benzimidazolového inhibitoru do vnitřní smyčky subdomény IIa poskytla studie, která sekvenční a strukturní model této subdomény s navázaným inhibitorem zkoumala pomocí metody NMR (Paulsen a kol., 2010). Tato data sice poskytla hrubou představu o změnách geometrie domény, ale pro detailní popis vazebných interakcí mezi RNA a inhibitorem bylo třeba získat strukturní data o vyšším rozlišení. Toho bylo dosaženo použitím rentgenové krystalografie (Dibrov a kol., 2012). Oligonukleotidový model subdomény IIa byl kokrystalizován s racemickou směsí benzimidazolového inhibitoru (jeho strukturní

vzorec je znázorněn na Obrázku 3.10-4) a struktura modelu byla určena za pomoci rentgenové difrakce s rozlišením 2,2 Å. Po vazbě molekuly benzimidazolového inhibitoru dochází k narovnání charakteristického ohnutí domény II IRES HCV a ve vnitřní smyčce subdomény IIa vzniká hluboká prohlubenina, „kapsa“, která obepíná molekulu inhibitoru (viz Obrázek 3.12).

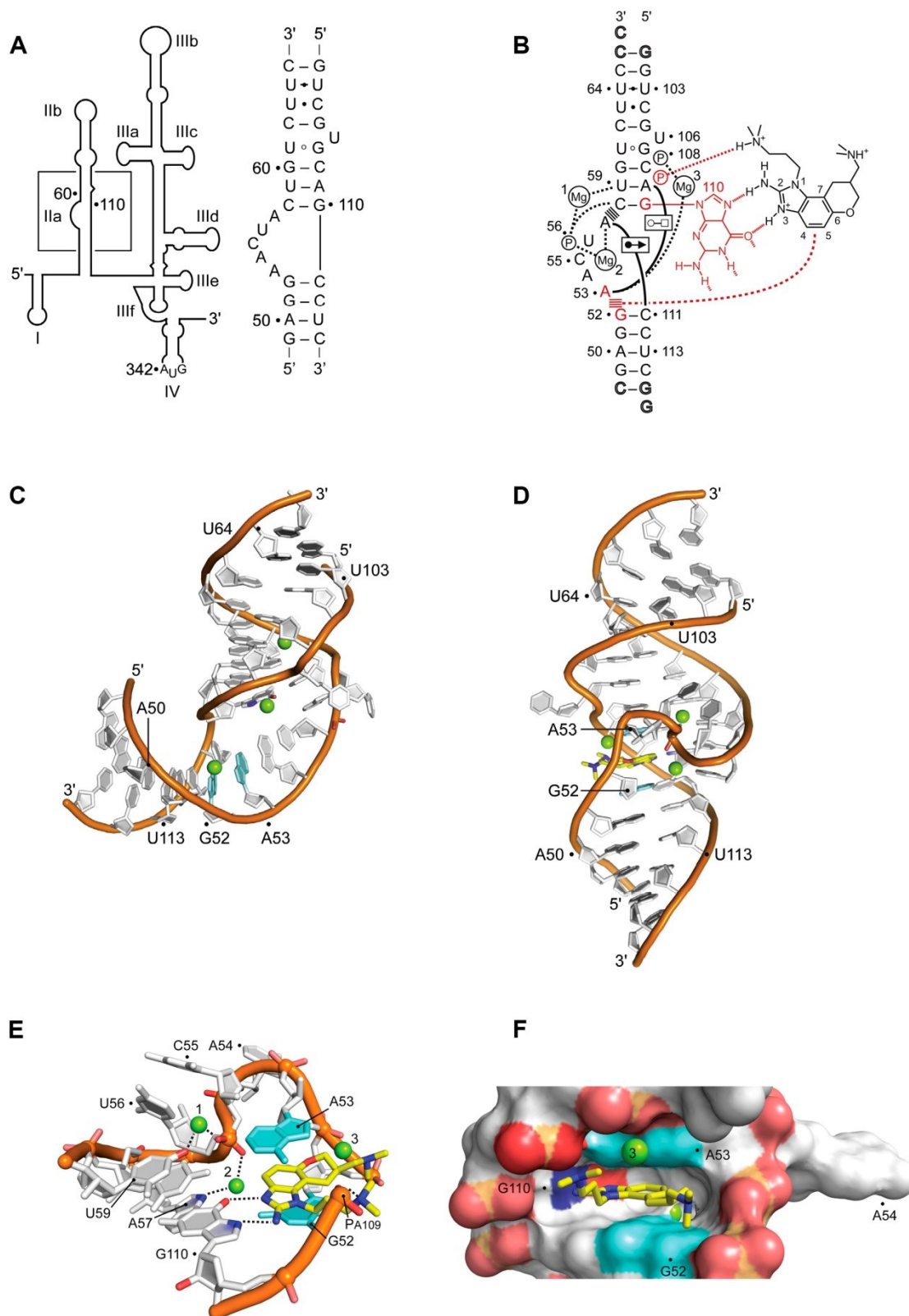


**Obr. 3.11.: Přehled úprav benzimidazolových translačních inhibitorů majících za následek změny schopnosti vázat se na IRES HCV.**

- (A) Skupiny navázané na uhlíky C1 a C2 jsou zásadní pro vazbu molekuly na RNA. Zlepšení vazby na IRES je dána připojením dimethylaminopropoxylového postranního řetězce.
- (B) Důvodem tvorby rigidnějších derivátů obsahujících vazbu mezi postranním řetězcem vázaným na atomu N1 a aminoskupinou atomu C2 je zlepšení vazebných schopností omezením konformačních stavů postranních skupin.
- (C) Zlepšení vazebných schopností derivátů modifikací postranních řetězců na atomech C6 a C7 (vlevo), resp. současně s tím provedenou úpravu popsanou v (B) (vpravo).
- (Upraveno podle Davis a Seth, 2011)

Benzimidazový inhibitor se do prohlubeniny v RNA váže prostřednictvím vodíkové vazby s párem bází C58-G110 a pomocí patrových interakcí mezi bázemi A53 a párem bází G52-C111 IRES HCV. Další intramolekulární vodíková vazba je tvořena mezi protonovaným dimethylaminopropylovým postranním řetězcem a fosfátovou skupinou báze A109. Vodíkové vazby s bází G110, které jsou uvnitř prohlubeniny stíněny před molekulami vody, zapříčiňují schopnost vazby polárního benzimidazolového derivátu na RNA i při vysokých koncentracích solí (2M síran amonný) použitých během krystalizace (Dibrov a kol., 2012). Na základě způsobu, jakým se váže molekula benzimidazolového inhibitoru do místa vytvořeného v RNA HCV, byla vyslovena hypotéza, že by tento mechanismus mohl být v buňce v podobné formě zprostředkován nějakým proteinem (Dibrov a kol., 2012). Aminoimidazolová struktura molekuly inhibitoru by mohla napodobovat strukturu argininového postranního řetězce, který je často přítomný u různých peptidů a proteinů interagujících s RNA či DNA (Puglisi a kol., 1993; Kondo a Westhof, 2011).

Jak již bylo zmíněno, pro možnost použití konkrétní nízkomolekulární látky jakožto translačního inhibitoru při léčbě infekce HCV je hlavní schopnost vazby do cílového místa nezávisle na sekvenci. Je tedy možno použít benzimidazolové deriváty proti různým genotypům HCV? Jak se ukázalo, sekvence subdomény IIa je silně konzervovaná. S výjimkou bází A57, C104 a G107 je sekvence této subdomény IRES HCV konzervována z více jak 99 % napříč klinickými izoláty různých genotypů HCV (Kuiken a kol., 2008). Míra konzervovanosti sekvence je znázorněna na Obrázku 3.13



**Obr. 3.12.: Změna struktury subdomény IIa IRES HCV po navázání benzimidazolového inhibitoru a popis interakcí mezi RNA a inhibitorem.**

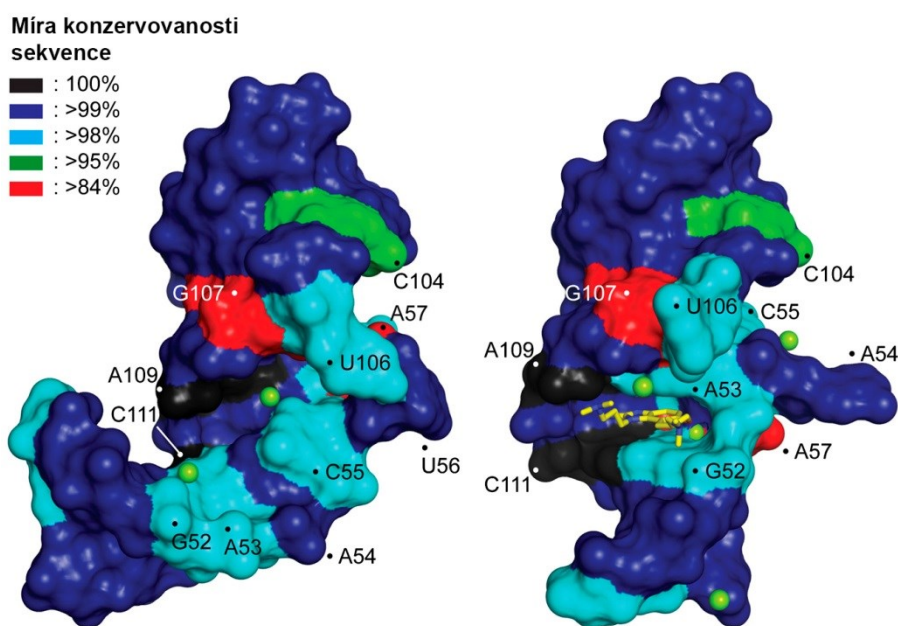
(A) Schématické znázornění 5' nepřekládané oblasti HCV genotypu 1b s rámečkem vyznačenou oblastí subdomény IIa a její sekvence.

(B) Schématické znázornění interakce mezi molekulou benzimidazolového inhibitoru (černě vpravo) a vnitřní smyčky subdomény IIa IRES HCV. Vodíkové můstky znázorněné čerchovanými čarami; párování bází odlišné od *Watson-Crickovského* typu párování

(Pokračování popisu obrázku na následující straně)

znázorněné černými čarami; patrové interakce znázorněné symboly  $\equiv$ ; antiparalelní interakce *Watson-Crickovské* a cukerné hrany bázi s *cis* orientací glykosidické vazby značený symbolem  $\bullet \rightarrow$  a antiparalelní interakce *Watson-Crickovské* a *Hoogsteenovy* hrany bázi s *trans* orientací glykosidické vazby značený symbolem  $\bigcirc \square$  podle nomenklatury popsané v (Leontis a kol., 2002); báze účastnící se interakce s molekulou inhibitoru znázorněné červeně.

- (C) Sekundární struktura subdomény IIa IRES HCV určená na základě krystalografických dat s jejím typickým ohybem v oblasti vnitřní smyčky.
- (D) Sekundární struktura komplexu subdomény IIa IRES HCV a benzimidazolového inhibitoru s pozměněnou geometrií RNA oproti struktuře (C).
- (E) Detail sekundární struktury vnitřní smyčky subdomény IIa IRES HCV s navázaným benzimidazolovým inhibitorem a vyznačenými interakčními partnery.
- (C) – (E) Molekula inhibitoru znázorněna žlutě;  $Mg^{2+}$  ionty znázorněny jako zelené kuličky; báze G52 a A53 tvořící interkalační místo pro inhibitor vyobrazeny azurově; vodíkové vazby znázorněny přerušovanými čarami.
- (F) Pohled na tutéž oblast jako v případě (E) se znázorněním povrchu a hluboké „kapsy“, do které se váže molekula inhibitoru.
- (Upraveno podle Dibrov a kol., 2012)



**Obr. 3.13.: Míra konzervovanosti sekvence RNA v oblasti subdomény IIa IRES HCV.**

Barevnou škálou jsou označeny oblasti subdomény IIa podle jejich konzervovanosti v různých klinických izolátech a různých genotypech HCV. Vlevo je ohnutá konformace domény II, vpravo pak lineární tvar domény II po navázání benzimidazolového inhibitoru.

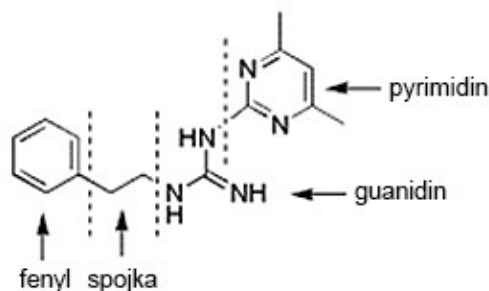
Molekula inhibitoru znázorněna žlutě; ionty  $Mg^{2+}$  znázorněny jako zelené kuličky.

(Upraveno podle Dibrov a kol., 2012)



### 3.4.3.5. Biarylguanidinové deriváty

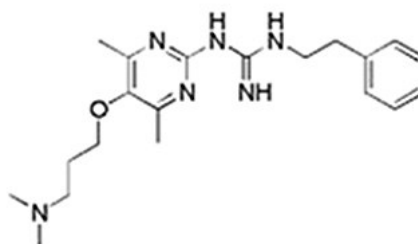
Prohledáním knihovny zhruba 180 tisíc chemických sloučenin bylo zjištěno, že biarylguanidinové sloučeniny se váží na IRES HCV a jsou schopny inhibovat translaci jím zprostředkovanou. Inhibice IRES je zhruba 2,5násobná oproti inhibici translace závislé na čepičce (Jefferson a kol., 2004). Jako základ pro další optimalizační pokusy při tvorbě derivátů byla vybrána molekula, jejíž strukturní vzorec je uveden na Obrázku 3.14.



**Obr. 3.14.: Strukturní vzorec výchozí biarylguanidinové sloučeniny.**

Tato sloučenina byla jedna ze dvou biarylguanidinů, u nichž byla prokázána schopnost inhibovat iniciaci translace závislou na IRES HCV. Její modifikace daly vzniknout dalším derivátům. (Upraveno podle Jefferson a kol., 2004)

Tvorba derivátů a zkouška jejich schopností inhibovat iniciaci translace zprostředkovanou IRES HCV nepřinesla mnoho pozitivních výsledků. Bylo ukázáno, že prodloužení uhlovodíkové spojky o tři uhlíkové atomy snižuje inhibiční schopnost zhruba 15×. Rovněž náhrada vodíkových atomů vázaných na dusíkové atomy guanidinu N-methylací vedla ke ztrátě inhibiční schopnosti. Také náhrada guanidinu jakožto základní součásti této skupiny inhibitorů za močovinu nebo thiomočovinu způsobila omezení inhibiční aktivity. Důležitost pyrimidinového konce molekuly byla ověřena několika substitucemi dusíkových nebo vodíkových atomů heterocyklu, které vždy způsobily pokles inhibičních schopností těchto derivátů. Čtyřnásobné zlepšení inhibiční aktivity oproti výchozí molekule vykazoval derivát s dimethylaminopropoxylovým postranním řetězcem na pyrimidinu (Jefferson a kol., 2004).



**Obr. 3.15.: Biarylguanidinový derivát s nejvyšší inhibiční aktivitou vůči IRES HCV.**

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo připojením dimethylaminopropoxylového postranního řetězce na pyrimidinové jádro původní biarylguanidinové molekuly. (Převzato z Jefferson a kol., 2004)



#### 3.4.3.6. Mifepriston

Syntetická steroidní sloučenina mifepriston, známá též jako RU486 nebo VGX-410,  $11\beta$ -[4-(dimethylamino)fenyl]- $17\beta$ -hydroxy- $17\beta$ -(prop-1-ynyl)-estradi-4,9-en-3-on, je antaginostou progesteronového receptoru. V klinické praxi se používal či používá jako kontraceptivum a abortivum (Bygdeman a kol., 1993).

Ve studii, jejíž výsledky byly zveřejněny pouze v podobě žádosti o patent, byl popsán antivirový účinek mifepristonu. Mechanismus této aktivity spočívá v ovlivnění proteinu mov34, který je součástí eIF3. Mifepriston tedy nereaguje přímo s IRES HCV, ale zabraňuje interakci eIF3 s IRES a tím inhibuje translaci závislou na IRES HCV (Kim, 2007). Jelikož se jednalo o v klinické praxi již používaný přípravek, dostaly se zkoušky brzy do fáze II. V té však bylo další zkoumání mifepristonu jakožto inhibitoru HCV zastaveno, neboť přípravek dosahoval velmi nízké efektivity při léčbě pacientů (zpráva Ministerstva zdravotnictví USA NCT00255177, 2009).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Chemikálie

Při práci na této diplomové práci byla použita řada chemikálií. Jejich kompletní přehled včetně výrobce a zkratk používaných v dalších kapitolách uvádí Tabulka 4.1.

**Tab. 4.1.: Přehled použitých chemikálií.**

Chemikálie jsou uvedeny v abecedním pořadí s uvedeným výrobcem a případně též zkratkou.

Název	Zkratka	Výrobce
agar		ForMedium
agarosa		Serva, Invitrogen
akrylamid		Serva
amoniumpersulfát	APS	Serva
ampicilin	Amp	Spofa, Sigma
ampicilin		Sigma, Spofa
beta-merkapt ethanol		Sigma
blasticidin S		InvivoGen
deionizovaná voda	ddH <sub>2</sub> O	
deoxynukleosidtrifosfáty	dNTP	Fermentas, Roche
dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma
dithiotreitol	DTT	AMRESCO
dodecylsírán sodný	SDS	Serva
dusičitan stříbrný		Lachema
ethanol		Lach-Ner
ethidium bromid	EtBr	Sigma
ethylendiamintetraoctová kyselina	EDTA	Serva
fenol		MERCK

(Pokračování tabulky na následující straně)

Název	Zkratka	Výrobce
<b>formaldehyd</b>		Lach-Ner
<b>formamid</b>		Sigma
<b>glycerol</b>		Sigma, Lach-Ner
<b>hydroxid sodný</b>	NaOH	Lachema
<b>8-hydroxychinolin</b>		Lachema
<b>hygromycin B</b>		InvivoGen
<b>chloroform</b>		Lach-Ner
<b>isoamylalkohol</b>		Lachema
<b>isopropanol</b>		Lach-Ner
<b>kanamycin</b>	Kan	Spofa
<b>kanamycin</b>		Spofa
<b>kyselina chlorovodíková</b>	HCl	Lachema
<b>močovina</b>		Sigma
<b>N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin</b>	TEMED	Sigma
<b>N,N'-methylenbisakrylamidem</b>		Serva
<b>octan draselný</b>	KAc	Sigma
<b>octan sodný</b>	NaAc	Sigma
<b>octová kyselina</b>		Lach-Ner
<b>phleomycin</b>		InvivoGen
<b>sacharosa</b>		Serva
<b>thiosíran sodný (pentahydrát)</b>		Lachema
<b>tris(hydroxymethyl)aminomethan</b>	Tris	Serva
<b>tris(hydroxymethyl)aminomethan chlorid</b>	Tris-Cl	Serva
<b>Triton X-100</b>		Serva
<b>Tween 20</b>		Serva/Sigma
<b>uhličitan sodný</b>		Lachema
<b>zeomycin</b>		InvivoGen

#### 4.1.2. Roztoky

Následující tři tabulky uvádějí seznam roztoků použitých v této práci. Tabulka 4.2 obsahuje seznam roztoků pro práci s DNA, které byly připraveny přímo v laboratoři podle popsaného složení. Tabulka 4.3 představuje přehled komerčních roztoků, které nebyly přímo součástí žádné komerční soupravy. V tabulce 4.4 je uveden seznam komerčních roztoků použitých pro práci s buněčnými kulturami a jejich, v některých případech alespoň přibližné, složení.

**Tab. 4.2.: Roztoky pro práci s DNA**

Abecední seznam roztoků použitých pro práci s DNA. Případné značení „N×“ označuje kolikrát koncentrovaný je takto připravený roztok.

Název	Složení
<b>3 M KAc</b>	59,7% (v/v) 5 M KAc; 10,9% ledová kyselina octová (v/v); 28,4% ddH <sub>2</sub> O
<b>3 M NaAc</b>	40,8 g/l NaAc
<b>roztok II</b>	1% (w/v) SDS; 0,2 M NaOH
<b>roztok III</b>	3 M octan draselný; 11,5% (v/v) kyselina octová
<b>STET roztok</b>	10% (v/v) sacharóza; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA-NaOH; 1% (v/v) Triton X-100
<b>50× TAE pufr</b>	24,2% (w/v) Tris-HCl; 5,7% (v/v) HCl; 10% 0,5M EDTA (pH 8,0)
<b>TEG roztok</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,5 mM EDTA; 10% glycerol (v/v)
<b>upravený fenol</b>	vodou nasycený fenol ekvilibrovaný 50 mM Tris-HCl na pH 8,0; 0,1% (w/v) 8-hydroxychinolin; 0,1% (v/v) β-merkptoethanol
<b>upravený chloroform</b>	chloroform a isoamylalkohol v poměru 24:1
<b>6× vzorkový pufr TGGE</b>	53,8% (v/v) 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8; 38,5% (v/v) glycerol; 7,6% (v/v) beta-merkptoethanol; 77 g/l SDS; 0,38 g/l brom-fenolová modř

**Tab. 4.3.: Komerční roztoky nezahrnuté v soupravách.**

Tabulka obsahuje abecední seznam komerčních roztoků, které nebyly přímo součástí žádné soupravy, a jejich složení. Případné značení „N×“ označuje kolikrát koncentrovaný je daný roztok.

Název	Složení/Výrobce
<b>dNTPs</b>	10 mM dATP; 10 mM dGTP; 10 mM dCTP; 10 mM dTTP; v ddH <sub>2</sub> O
<b>10× PCR pufr pro Taq polymerasu</b>	100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)
<b>10× reakční pufr alkalická fosfatasa</b>	0,1 M Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C); 0,1 M MgCl <sub>2</sub> ; 1 mg/ml BSA (Fermentas)
<b>10× reakční pufr Klenowův fragment</b>	500 mM Tris-HCl (pH 8,0 při 25 °C); 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT (Fermentas)
<b>10× reakční pufr T4 DNA ligáza</b>	40 mM Tris-HCl (pH 7,8 při 25 °C); 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP (Fermentas)
<b>6× vzorkový pufr DNA elektroforesa</b>	10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,03% bromfenolová modř; 0,03% xylén cyanol; 60% (v/v) glycerol; 60 mM EDTA (Fermentas)

**Tab. 4.4.: Komerční roztoky pro práci s buněčnými kulturami**

Tabulka uvádí abecední seznam komerčních roztoků, které byly používány pro práci s buněčnými kulturami. Kromě výrobce je uvedena alespoň nejdůležitější charakteristika daného proteinu. Případné značení „N×“ označuje kolikrát koncentrovaný je daný roztok.

Název	Složení/Výrobce
<b>100× roztok antibiotik a antimykotik</b>	10000 U/ml penicilinu, 10000 µg/ml streptomycinu, 25 µg/ml amfotericinu B (Invitrogen)
<b>DMEM médium</b>	glukosa 4,5 g/l, L-glutamin, hydrogenuhličitan sodný, pyridoxin-HCl (Sigma)
<b>fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)</b>	0,0067 M PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (Lonza)
<b>Opti-MEM médium</b>	redukované médium, s L-glutaminem, bez fenolové červeni (Invitrogen)
<b>trypsin-EDTA</b>	0,05% trypsin-EDTA s fenolovou červení (Invitrogen)
<b>fetální bovinní sérum (FBS)</b>	(Biochrom)

### 4.1.3. Enzymy

Enzymy, které byly použity v této práci, uvádí Tabulka 4.5.

**Tab. 4.5.: Přehled použitých enzymů.**

Abecední seznam enzymů použitých v této práci včetně koncentrace (počet jednotek enzymu na mikrolitr) a výrobce.

Název	Koncentrace [U/μl]	Výrobce
<b>Alkalická fosfatasa z arktických krevet (SAP)</b>	1	Fermentas
<b>Klenowův fragment</b>	2	Fermentas
<b>Pfu polymerasa</b>	5	Fermentas
<b>restrikční endonukleasy (různé)</b>	10	Fermentas
<b>ribonukleasa A</b>	58	Sigma
<b>T4 DNA ligasa</b>	5	Fermentas
<b>Taq polymerasa</b>	5	Fermentas

### 4.1.4. Komerční soupravy

Řada postupů popsanych v této práci je provedena pomocí komerčních souprav. Jejich abecední přehled uvádí Tabulka 4.6.

**Tab. 4.6.: Přehled použitých komerčních souprav.**

Abecední přehled komerčních souprav a jejich výrobce.

Název	Výrobce
<b>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</b>	Applied Biosystems
<b>Dual-Luciferase Reporter Assay System</b>	Promega
<b>Fast DNA End Repair Kit</b>	Thermo scientific
<b>FastBack DNA Minispin Kit</b>	Renogen Biolab
<b>High Pure PCR Product Purification Kit</b>	Roche
<b>TurboFect Transfection Reagent</b>	Fermentas
<b>XNAPS Plasmid Flexspin Kit</b>	Renogen Biolab

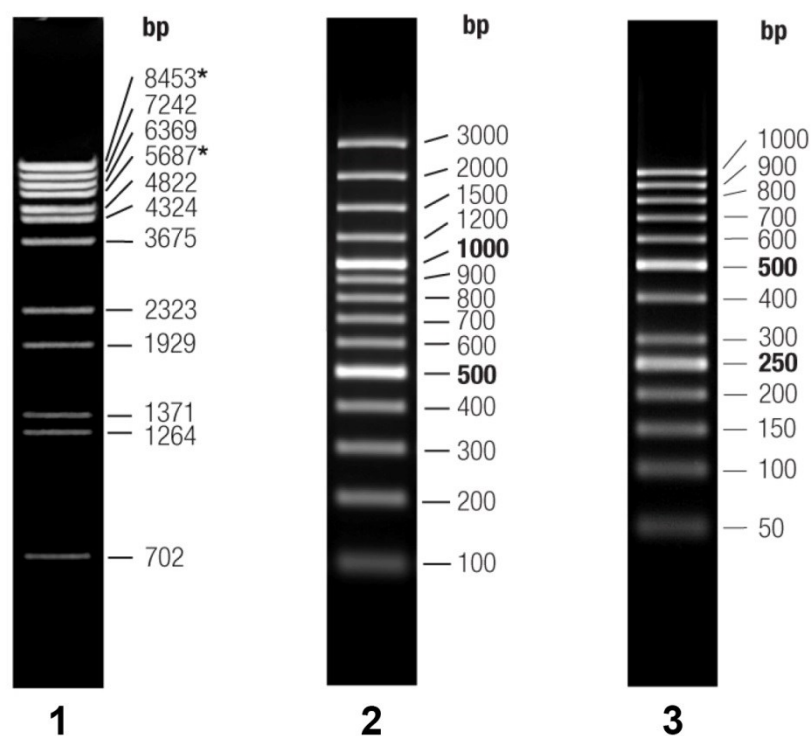
#### 4.1.5. Standardy molekulových hmotností

Pro určení velikosti fragmentů DNA při jejich rozdělení agarosovou elektroforesou byly použity standardy molekulových hmotností uvedené v Tabulce 4.7. Velikosti fragmentů obsažených v těchto standardech jsou popsány na Obrázku 4.1.

**Tab. 4.7.: Přehled použitých standardů molekulových hmotností.**

Použité standardy, jejich výrobce a zavedení označení používaného v následujících kapitolách.

Název	Výrobce
<b>Lambda DNA/Eco91I (BstEII)</b> dále označovaný jako M1	Fermentas
<b>GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder</b> dále označovaný jako M2	Fermentas
<b>GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder</b> dále označovaný jako M3	Fermentas



**Obr. 4.1.: Přehled použitých molekulových standardů DNA.**

(1) Standard Lambda DNA/Eco91I (BstEII).

(2) Standard GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

(3) Standard GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder.

Velikosti fragmentů uvedeny v párech bází. Hvězdičkou označené fragmenty se mohou spojovat za vzniku neznázorněného fragmentu o velikosti součtu velikostí daných fragmentů.

#### 4.1.6. Vektory

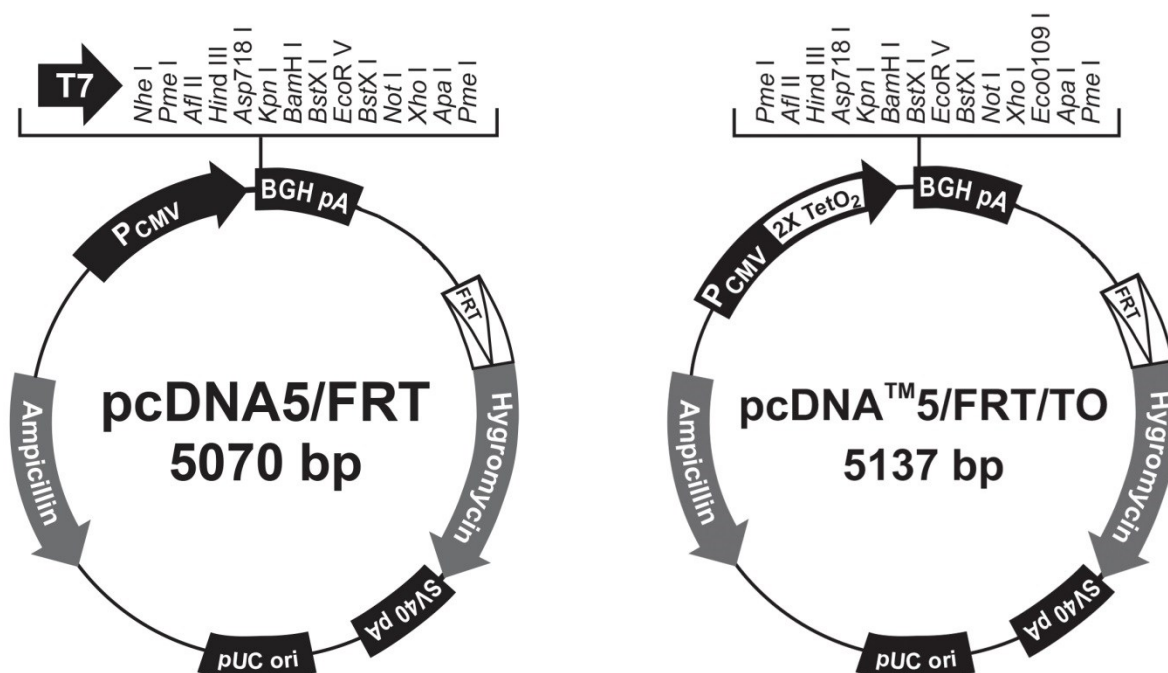
Seznam vektorů, které byly použity v této práci, je uveden v Tabulce 4.8. Mapy nejdůležitějších z nich jsou znázorněny na Obrázcích 4.2, 4.3 a 4.4.

**Tab. 4.8.: Přehled použitých vektorů.**

Seznam vektorů použitých v této práci včetně udání jejich původu.

Název	Původ
<b>pRG</b>	(Mašek a kol., 2007)
<b>pRFh+HCV1/1</b>	T. Mašek, nepublikováno
<b>pRFh</b>	T. Mašek, nepublikováno
<b>pEF1/myc-His A</b>	Invitrogen
<b>pcDNA5/FRT</b>	Invitrogen
<b>pcDNA5/FRT/TO</b>	Invitrogen
<b>pOG44</b>	Invitrogen
<b>pcDNA5/FRT/TO/R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/TO/R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/TO/R_L</b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math></b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	tato práce
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/R_L</b>	tato práce



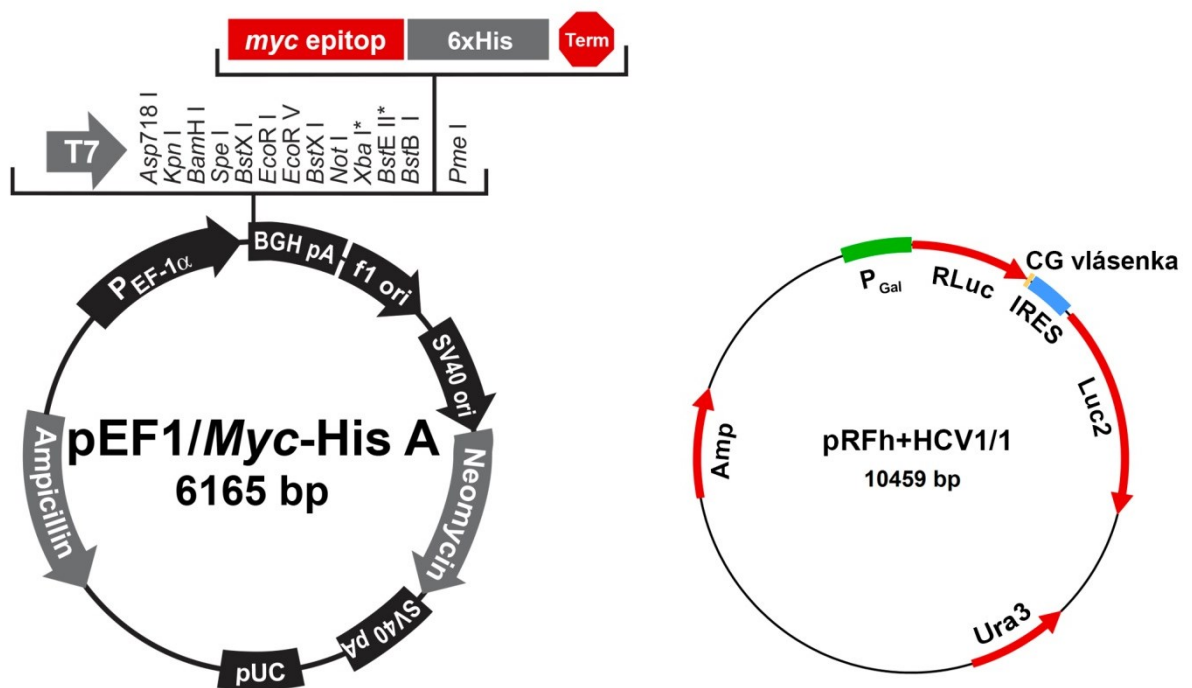


**Obr. 4.2.: Mapa vektorů pcDNA5/FRT a pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen).**

Název a velikost obou vektorů je vyznačena v obrázku. Vektory **pcDNA5/FRT** a **pcDNA5/FRT/TO** obsahují shodně: **P<sub>CMV</sub>** - časný promotor lidského cytomegaloviru; oblast **polylinkeru** s vyznačenými restrikčními endonukleasami štěpícími v této oblasti; **BGH pA** - polyadenylační sekvence pocházející z bovinního růstového faktoru; **FRT** - rekombinační místo rozpoznávané Flp-In rekombinasou; **Hygromycin** - gen zajišťující odolnost vůči tomuto antibiotiku, ve vektorech ovšem neobsahuje iniciační kodon ATG, gen je funkční až po zdařilé rekombinaci do genomu buňky buněčné linie; **SV40 pA** - časný polyadenylační signál pocházející z viru SV40; **pUC** - bakteriální replikační počátek vektoru; **Ampicilin** - gen zajišťující odolnost vůči tomuto antibiotiku při vnesení do bakterií.

Vektor **pcDNA5/FRT** navíc v oblasti **polylinkeru** obsahuje **T7** promotor/místo rozpoznávané primerem T7.

Vektor **pcDNA5/FRT/TO** má CMV promotor fúzovaný s tetracyklinovým operátorem **2× TetO<sub>2</sub>**.



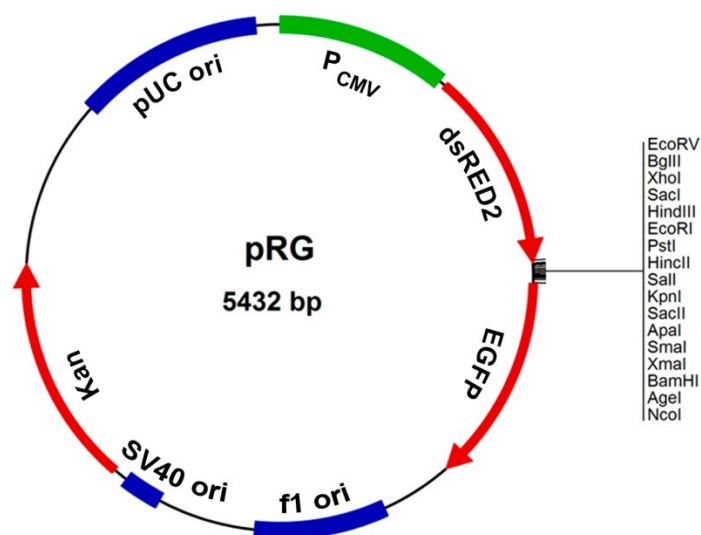
**Obr. 4.3.: Mapa vektorů pEF1/Myc-His A (Invitrogen) a pRFh+HCV1/1.**

Název a velikost obou vektorů je vyznačena v obrázku.

Vektor **pEF1/Myc-His A** obsahuje: **P<sub>EF-1α</sub>** - promotor alfa podjednotky lidského elongačního faktoru 1; oblast **polylinkeru** s vyznačenými restrikčními endonukleasami, které v daném místě štěpí; **polylinker** též obsahuje **T7** promotor/místo rozpoznávané primerem T7 a značku pro snazší purifikaci proteinu; **pUC** - bakteriální replikační počátek vektoru; **Ampicilin** - gen zajišťující odolnost vůči tomuto antibiotiku v bakteriích. Další části tohoto vektoru nejsou vzhledem k jeho použití v této práci podstatné.

Vektor **pRFh+HCV1/1** obsahuje: **P<sub>Gal</sub>** - promotor Gal operonu; **RLuc** - gen kódující luciferasu pocházející z organismu *Renilla reniformis*; **CG vlásenka** - termostabilní vlásenka tvořená sekvencí 13G-3A-13C; **IRES** - sekvence 5' konce genomu HCV obsahující IRES; **Luc2** - gen pro luciferasu pocházející ze světlušky *Photinus pyralis*, jehož sekvence byla upravena pro použití v savčích buňkách; **Ura3** - selekční gen pro použití v kvasinkových buňkách; **Amp** - gen zajišťující rezistenci vůči ampicilinu v transformovaných bakteriích.

Vektor **pRFh** je téměř identický s vektorem **pRFh+HCV1/1**, liší se pouze absencí oblasti označené IRES obsahující IRES HCV.



**Obr. 4.4.: Mapa vektoru pRG.**

**P<sub>CMV</sub>** - časný promotor lidského cytomegaloviru; **dsRED2** - gen kódující stejnojmenný červený fluorescenční protein; znázorněná poloha *polylinkeru* a restrikční endonukleasy, které v této oblasti štěpí; **EGFP** - gen kódující zelený fluorescenční protein, jehož aminokyselinová sekvence se oproti původnímu GFP liší, díky čemuž poskytuje silnější signál; **f1 ori** - replikační počátek pocházející z fága f1, umožňuje tvorbu ssDNA molekuly; **SV40 ori** - replikační počátek odvozený od viru SV40; **Kan** - gen zajišťující rezistenci transformované bakterie vůči kanamycinu; **pUC ori** - bakteriální replikační počátek vektoru.

#### 4.1.7. Oligonukleotidové primery

Seznam oligonukleotidových primerů použitých v této práci uvádí Tabulka 4.9

**Tab. 4.9.: Přehled použitých oligonukleotidových primerů**

Název	Sekvence (orientace 5' → 3')
HCVIRESf-Sal-clamp	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCC GGTCGACGCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACAC
Reverse BamHI	GGATCCGTGTTACGTTTGGTTTTTCTTTGAGGTTTAGG
HCVIRESf-SalI	AAAGTCGACGCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACAC
HCVIRESr-BamHI	ACGGATCCGTGTTACGTTTGGTTTTTCTTTGAGGTTTAGG
RiL_forw_BglII	CGAGATCTATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCA
luc2Xho	TTTCTCGAGTTACACGGCGATCTTGCC
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
RenLuc_3Seq	GAAGGTGCCAAGAAGTTT
RenLuc_5Seq	CTGCATGTTTTTCTGAATC
FLUC2seqrev	AGGTAATGTCCACCTCGATA
EF1alfa_ForwSeq	CTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
DsRedSeqPrimer	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG

#### 4.1.8. Mikroorganismy

- ***Escherichia coli* XL1-Blue:** recA1; endA1; gyrA96; thi-1; hsdR17; supE44; relA1; lac [F' proAB+; lacIqZ; ΔM15; Tn10 (Tetr)]. (Stratagene)

#### 4.1.9. Buněčné kultury

- **HEK 293T:** lidské embryonální ledvinné buňky konstitutivně produkující velký T-antigen viru SV40; sbírkové označení ATCC CRL-11268.
- **Huh-7:** buňky lidského hepatocelulárního karcinomu; sbírkové označení JCRB0403.
- **CCL13:** někdy též označovány jako Changovy buňky; původně pokládány za izolát z běžné lidské jaterní tkáně, bylo ale zjištěno, že vykazují podobnost s HeLa buňkami; jedná se tak pravděpodobně o kontaminaci původního vzorku HeLa buňkami; sbírkové označení ATCC CCL-13.
- **Flp-In 293:** komerční buňky vytvořené na základě lidských embryonálních ledvinných buněk HEK 293 s vloženým FRT rekombinačním místem v genomu; určeny pro tvorbu stabilních linií; konstitutivní transkripce insertu zajištěna časným promotorem lidského cytomegaloviru. (Invitrogen)
- **Flp-In 293 T-Rex** komerční buňky vytvořené na základě lidských embryonálních ledvinných buněk HEK 293 s vloženým FRT rekombinačním místem v genomu; určeny pro tvorbu stabilních linií; transkripce insertu indukovatelná tetracyklinem díky cytomegalovirovému promotoru s tetracyklinovým operátorem. (Invitrogen)

#### 4.1.10. Kultivační média

##### 4.1.10.1. Bakteriální kultivační média

###### Tekutá média

- 2× TY médium: 1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl; upraveno pomocí NaOH na pH 7,0
- Pro přípravu selekčního média bylo přidáno do 2× TY média potřebné antibiotikum (ampicilin 100 µg/ml; kanamycin 50 µg/ml)

###### Agarové půdy

- 2× TY médium + 2% agar; případně antibiotikum ve stejném množství jako pro tekutá média

#### **4.1.10.2. Kultivační média buněčných kultur**

- Kompletní médium: DMEM médium, 10% FBS, 1× koncentrovaný roztok antibiotik a antimykotik
- Zamrazovací médium: DMEM médium, 20% FBS, 10% DMSO

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. Práce s mikroorganismy**

#### **4.2.1.1. Kultivace bakterií**

Kultivace bakteriálních kmenů v tekutém médiu probíhala v aerobních podmínkách, za třepání v reciproké nebo orbitální třepačce v Erlenmayerových baňkách při teplotě 37 °C.

Kultivace na agarových půdách byla prováděna při teplotě 37 °C v termostatu.

#### **4.2.1.2. Skladování mikroorganismů**

Krátkodobě byly bakteriální kultury udržovány na agarových plotnách při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé uchování byly napěstovány v tekuté kultuře do stacionární fáze růstu, odebrány a skladovány v 25 % roztoku glycerolu při teplotě -80 °C.

### **4.2.2. Práce se savčími buněčnými kulturami**

#### **4.2.2.1. Kultivace buněčných kultur**

Kultivace buněčných kultur adherentního typu probíhala v tekutém médiu při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a při 95% vlhkosti. Veškerá manipulace s otevřenými kulturami probíhala v laminárním boxu.

#### **4.2.2.2. Pasážování buněčných kultur**

Z buněčné kultury, která dosáhla téměř 100% konfluency, bylo v laminárním boxu odsáto médium, buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrem a od dna Petriho misky byly uvolněny roztokem trypsinu. Poté k nim byl přidán původní objem kompletního média a buněčná suspenze byla přenesena do nových Petriho misek a naředěna v nich v čerstvém kompletním médiu v poměru 1:5 až 1:10.

#### 4.2.2.3. Skladování buněčných kultur

Pro dlouhodobé uchování byly buňky zamrazeny a uchovávány v tekutém dusíku:

- Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 300 g.
- Supernatant byl odsát a buněčná peleat byla promyta 1 ml PBS.
- Buňky byly centrifugovány 4 min při 300 g.
- Buňky byly rozpuštěny v zamrazovacím médiu a v kryozkumavkách umístěny do -80 °C v zamrazovacím stojanu (Mr. Frosty, NALGENE) díky kterému byl pokles teploty řízeně o 1 °C/min.
- Druhý den byly buněčné konzervy přeneseny do zásobníku s tekutým dusíkem, kde byly dlouhodobě uchovávány.

V případě potřeby byly konzervy buněčné kultury vytaženy z tekutého dusíku a připraveny pro další použití:

- Kryozkumavka s konzervou byla po vytažení vhozena do vodní lázně zahřáté na 37 °C.
- Bezprostředně po rozmrznutí konzervy byl celý její objem přenesen do zkumavky a buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 300 g.
- Supernatant byl odsát, buněčná peleta byla rozpuštěna v 10 ml čerstvého média a buňky byly dále kultivovány na dvou šesticentimetrových Petriho miskách běžným způsobem.

### 4.2.3. Práce s DNA

#### 4.2.3.1. Izolace DNA

##### 4.2.3.1.1. Minipreparace plazmidů z *Escherichia coli*

- Přes noc byly bakteriální kultury nechány růst na agarových plotnách se selekčním médiem při 37 °C.
- Sterilním párátkem bylo přeneseno množství bakteriální biomasy odpovídající ploše cca 3×2 cm do 400 µl STET roztoku a přidáno 5 µl 5% lysozymu.
- Suspenze byla důkladně resuspendována a inkubována minimálně 2 min při 95 °C.
- Při laboratorní teplotě byly vzorky centrifugovány 10 min při 13000 g.
- Buněčná peleta byla párátkem odstraněna.
- K supernatantu byl přidán stejný objem isopropanolu, roztok byl důkladně promíchán a inkubován po 30 min při -20 °C.

- Roztok byl centrifugován 15 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Supernatant byl odstraněn a sediment byl opláchnut 500 µl 70% EtOH.
- Opět byl roztok centrifugován 10 min při 13000 g a laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a peleta byla dokonale vysušena ve vakuové odparce.
- Vysušená peleta byla resuspendována v 30 µl TE roztoku.

#### **4.2.3.1.2. Midipreparace plazmidů z *E. coli***

- Kultura *E. coli* nesoucí příslušný plazmid byla napěstována přes noc v 2×TY médiu obsahujícím příslušné selekční antibiotikum
- Bakteriální kultura byla centrifugována 10 min při 5000 g.
- Sediment byl důkladně resuspendován v 2 ml roztoku TEG, byly přidány 4 ml roztoku II, roztok opatrně promíchán a nechán inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
- Byly přidány 3 ml roztoku III, výsledný roztok byl opatrně promíchán a nechán inkubovat 20 minut na ledu.
- Poté byl roztok centrifugován 30 min při 5000 g a 4 °C
- Supernatant byl přefiltrován přes gázu, bylo přidáno 0,7 objemu isopropanolu a roztok byl nechán inkubovat 10 minut na ledu.
- Poté byl roztok centrifugován 30 min při 5000 g a 4 °C.
- Sediment byl promyt 3 ml 70% EtOH a nechán vyschnout při laboratorní teplotě.
- Sediment byl rozpuštěn v 300 µl TE pufru, přidány 3 µl TRN a roztok byl nechán inkubovat 1 hodinu při 37 °C.
- DNA byla extrahována jedním objemem upraveného fenolu, jedním objemem směsi upraveného fenol a upraveného chloroformu v poměru 1:1 (opakováno, dokud byla viditelná mezifáze tvořená vysráženými proteiny) a jedním objemem upraveného chloroformu.
- K supernatantu bylo přidáno 0,1 objemu 3M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu a roztok byl nechán inkubovat přes noc při -20 °C.
- Poté byl sediment centrifugován 10 min na maximální otáčky, sediment promyt 1 ml 70% ethanolu, vysušen a rozpuštěn ve 100 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.2.3.1.3. Minipreparace plazmidů z *E. coli* pomocí soupravy XNAPS**

Izolace touto metodou byla používána pro získání templátu k sekvenování.

- Kultura *E. coli* nesoucí příslušný plazmid byla napěstována přes noc v 2×TY médiu obsahujícím příslušné selekční antibiotikum
- Odebraných 5 ml kultury bylo centrifugováno 5 min při 5000g.
- Sediment byl resuspendován v 200 µl pufru S1 pipetováním.

- Bylo přidáno 200 µl pufru S2, opatrně promícháno otočením mikrozkušavky a necháno inkubovat 2-4 min při laboratorní teplotě
- Poté bylo přidáno 350 µl pufru S3, opatrně promícháno otáčením mikrozkušavky a necháno inkubovat 1 min při laboratorní teplotě.
- Vzorek byl centrifugován 1 min při maximálních otáčkách, supernatant byl přenesen do dodaných kolonek a bylo k němu přidáno 100 µl dodané DNA vazebné matrice.
- Po 1 minutě inkubace při laboratorní teplotě byl vzorek centrifugován 1 min při 11000 g a laboratorní teplotě
- Kolonka s navázanou DNA byla promyta 700 µl pufru WB, centrifugována 1 min při 11000 g, z jímací části kolonky vylit pufr a krok zopakován tentokrát s 250 µl a opětovnou centrifugací 1 min při 11000 g.
- Vrchní část kolonky se skleněnou fritou byla přenesena do čisté mikrozkušavky.
- Na fritu bylo napipetováno 100 µl ddH<sub>2</sub>O vytemperované na 60 °C, necháno inkubovat 1 minutu a poté centrifugováno 2 min při 11000 g. Voda s DNA byla jímána do čisté mikrozkušavky.

#### **4.2.3.1.4. Izolace DNA z agarosového gelu pomocí FastBack DNA Minispin Kit**

- Oblast 0,5% agarosového gelu s požadovanou DNA byla vyříznuta a přenesena do předem zvážené mikrozkušavky. Poté byla mikrozkušavka i s obsahem znovu zvážena.
- Do mikrozkušavky byl přidán rozpouštěcí roztok o objemu (ml) rovném trojnásobku váhy agarosového gelu (g).
- Agarosový gel byl rozpuštěn při 60 °C po dobu 5 min za občasného promíchání.
- Suspenze byla přenesena do centrifugační kolonky a centrifugována 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Sedimentovaná tekutina byla z jímací části kolonky odstraněna. Do kolonky bylo přidáno 750 µl promývacího roztoku a opět byla kolonka centrifugována 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Promývací krok byl ještě jednou opakován s 250 µl promývacího roztoku.
- Po odstranění jímací zkumavky byla kolonka vložena do mikrozkušavky. Do kolonky bylo vneseno 30 µl ddH<sub>2</sub>O. Následovala centrifugace 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě. Voda s DNA byla jímána do mikrozkušavky.



#### **4.2.3.1.5. Přečištění produktu PCR reakce pomocí High Pure PCR Product Purification Kit**

- Po dokončení PCR reakce byl obsah mikrozkušavky přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky a byla přidána ddH<sub>2</sub>O pro dosažení celkového objemu 100 µl.
- Do mikrozkušavky bylo přidáno 500 µl DNA vazebného pufru ze soupravy a obsah byl důkladně promíchán.
- Byla sestavena centrifugační kolonka z horní části s fritou a dolní sběrné části. Do horní části byl přenesen roztok z mikrozkušavky a tento byl centrifugován 60 s při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Supernatant byl z dolní části vylit a do horní části bylo přidáno 500 µl promývacího pufru ze soupravy. Vzorek byl centrifugován při výše popsáných podmínkách.
- Supernatant byl vylit a do horní části bylo přidáno 200 µl promývacího pufru. Vzorek byl opět centrifugován za stejných podmínek.
- Horní část kolonky byla přenesena do čisté mikrozkušavky, na skleněnou fritu bylo naneseno 50-100 µl vody a vzorek byl centrifugován za stejných podmínek. Voda jímáná do mikrozkušavky obsahovala čistou DNA vytvořenou pomocí PCR reakce.

#### **4.2.3.1.6. Precipitace DNA ethanolem v prostředí octanu sodného**

Precipitace DNA slouží k vysrážení DNA z vodného roztoku přidáním koncentrovaného etanolu. Přečištěná DNA je rozpuštěna ve vhodném pufru nebo ddH<sub>2</sub>O.

- Bylo přidáno 10 µl 3M NaAc + 1ml 96% EtOH.
- DNA byla nechána srážet se minimálně 1 hod při -20 °C.
- Vzorek byl centrifugován 5 min při 13000 g.
- Supernatant byl vylit a byl přidán 1 ml 70% EtOH, vzorek byl promíchán a centrifugován 5 min při 13000 g.
- EtOH byl odsán a peleta DNA byla nechána sušit 15 min při 50 °C.
- Usušená peleta byla rozpuštěna ve 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.2.3.2. Měření koncentrace DNA**

Pro běžnou práci s DNA byla její koncentrace odhadována při elektroforetické analýze.

Pro transformaci DNA byla koncentrace DNA měřena na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop-1000 (Thermo Scientific) v objemu roztoku DNA 1,5 µl.

#### 4.2.3.3. Agarosová elektroforesa

- Množství agarosy odpovídající požadované koncentraci gelu (viz Tabulka 4.10) bylo rozpuštěno ve 100 ml 1× koncentrovaném TAE pufru.
- Po zchlazení roztoku cca 60 °C byl nalit do vaničky a přidán do něj ethidium bromid o výsledné koncentraci 0,1 µg/ml. Následně byl vložen hřeben s potřebným počtem zubů a gel byl ponechán při pokojové teplotě, aby ztuhnul.
- Po ztuhnutí byl z gelu vyndán hřeben, gel spolu s vaničkou byl přenesen do elektroforetické aparatury a převrstven 1× koncentrovaným TAE pufrem.
- Do jamek vytvořených hřebenem byly nanесeny vzorky a případně i odpovídající standard molekulových hmotností.
- Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického napětí a na gel vloženo napětí o hodnotě 5-7 V/cm gelu. Doba působení elektrického napětí byla přibližně 45 minut.
- Gel byl poté vyfocen pod UV zářením systémy EDAS-290 či Gel Logic 112 Imaging System (Carestream) umístěnými na transluminátoru.

**Tab. 4.10.: Použité koncentrace agarosového gelu pro různou velikost zkoumaného fragmentu DNA.**

Tabulka udává, jaké množství agarosy je potřeba rozpustit ve 100 ml pufru pro dosažení takové koncentrace gelu, ve které se optimálně rozdělují fragmenty DNA o dané velikosti.

Velikost fragmentů DNA [kbp]	Koncentrace agarosového gelu [%]	Množství agarosy na 100 ml gelu [g]
1 – 20	0,5	0,5
0,8 – 10	0,8	0,8
0,5 – 7	1	1
0,3 – 6	1,2	1,2
0,2 – 4	1,5	1,5
0,1 – 2	2	2

#### 4.2.3.4. Gelová elektroforesa v teplotním gradientu (TGGE)

U gelové elektroforesy v teplotním gradientu (TGGE) vzorky putují gelem v elektrickém poli tak jako při běžné gelové elektroforéze, avšak TGGE přidává faktor teplotního gradientu. Pokud vzorky DNA putují stejným směrem, jako je směr vzrůstání teploty, dochází k jejich postupné denaturaci. Denaturovaná molekula DNA je ve svém postupu gelem bržděna. Tím je dosaženo rozdělení vzorků na základě jejich sekvence. Pokud je směr elektrického pole kolmý na směr teplotního gradientu, je obvykle na gel nanášeno velké množství jednoho vzorku po celé šířce gelu.

Jednotlivé části vzorku tak putují celou dobu ve stejné teplotě a na základě své denaturační charakteristiky doputují v různých částech gelu různě daleko. Na základě pokusu v takovéto konfiguraci je možno získat informaci o denaturační charakteristice daného vzorku.

Aby však nedošlo ke kompletnímu rozpadu dvoušroubovic na jednotlivá vlákna, je nutno vzorky namnožit pomocí PCR s primery, z nichž jeden obsahuje takzvanou GC svorku. Tento úsek DNA má natolik vysokou teplotu tání, že je schopen v průběhu experimentu udržet pohromadě jinak denaturovaná vlákna vzorku v běžně používaném rozsahu teplotního gradientu.

### **Příprava gelu**

Výsledný 70% denaturační polyakrylamidový gel byl připraven smísením dvou dílčích roztoků označovaných jako „0%“ a „100%“ v závislosti na absenci či přítomnosti denaturačních činidel. Jejich složení je uvedeno v Tabulce 4.11.

- Oba dílčí roztoky byly namíchány do kádinek a „100%“ roztok byl dán na magnetickou míchačku se zapnutým ohřevem na střední intenzitu ohřevu.
- Skla elektroforetické aparatury byla umyta 70% EtOH a sklo opatřené postranními lištami a výstupky pro vytvoření jamek bylo ošetřeno podle návodu k aparatuře roztokem *Acryl-Glide* dodávaným spolu s aparaturou. Na druhé sklo bylo nanášeno několik kapek vody a přiložen umělohmotný film dodávaný k aparatuře. Skla byla za použití gumové izolace složena a zajištěna svorkami.
- Mezi sklo s výstupky a umělohmotný film byla vsunuta injekční jehla se stříkačkou bez pístu.
- Dílčí roztoky byly smíchány v poměru 35 ml „100%“ a 15 ml „0%“ a bylo přidáno 120 µl APS a 110 µl TEMED a dostatečně promícháno.
- Výsledný roztok byl rychle přelit do stříkačky, na kterou byl nasazen píst a podle potřeby byl jemně stlačován, aby roztok vytékal plynule, ale dostatečně rychle – hrozí nebezpečí zatuhnutí v injekční jehle. V okamžiku, kdy hladina dosahovala 0,5 cm pod horní okraj skel, byla injekční stříkačka i s jehlou vytažena.
- Gel byl nechán polymerovat zhruba po dobu jedné hodiny. V tomto stavu je možno gel skladovat při laboratorní teplotě několik dní.
- Poté byla skla rozebrána tak, aby zůstal gel pevně ukotven na umělohmotném filmu. V této podobě byl co nejdříve použit pro elektroforesu v teplotním gradientu.

**Tab. 4.11.: Složení dílčích roztoků pro přípravu gelu pro elektroforesu v teplotním gradientu.**

Zásobní roztok	Dílčí roztoky pro přípravu gelu	
	0%	100%
30% akrylamid/ 0,8% bisakrylamid [ml]	5,00	10,00
Močovina [g]	----	21,02
Formamid [ml]	----	20,00
Glycerol [ml]	----	1,00
1× TAE pufr [ml]	1,00	1,00
ddH <sub>2</sub> O [ml]	19,00	doplnit do celkového objemu 50 ml

### Elektroforesa

- Připravený gel byl přenesen na vyhřívanou plochu aparatury pro TGGE (TGGE Maxi System [Biometra]). Na tuto plochu je volitelně možno nanést několik kapek 0,1% Tritonu X-100 nebo 0,1% Tweenu 20 pro zlepšení přenosu tepla mezi termoblokem aparatury a gelem.
- Do jamek bylo nanášeno 5 µl vzorku (pro jejich přípravu pomocí PCR viz kapitolu 4.2.3.6) smíchaného s 1 µl 10× koncentrovaného vzorkového pufru pro TGGE.
- Na gel byl opatrně položen menší umělohmotný film tak, aby pokrýval oblast, v níž dochází k následnému dělení vzorků, avšak nikoliv samotné jamky. Na protilehlých koncích gelu tedy zůstaly oblasti obnaženého gelu nekrytého vrchním filmem.
- Do vaniček s elektrodami byl nalit 1× TAE pufr, v kterém byly namočeny 2 houbičky, které byly posléze umístěny jedním koncem do vaničky s pufrem a elektrodami a druhým koncem přiloženy na koncové oblasti gelu nekryté vrchním filmem. Tím byl zajištěn průchod elektrického proudu gelem.
- Na termoblok s gelem a houbičkami byl nasunut plastový kryt. Jeho otevřené konce, kterými procházely houbičky do vaniček, byly ještě navíc zakryty potravinovou fólií. Tím bylo zajištěno, že nedocházelo během dělení vzorku k vypařování a narušování procesu správného rozdělení vzorků v gelu.
- Celá aparatura byla poté zakryta velkým víkem a připojena elektrodami ke zdroji elektrického proudu.
- Byl nastaven program: 100 V, doba dělení 16 h, teplotní gradient termobloku 40-60 °C. Vlastní elektroforesa byla spuštěna po zhruba 10 minutách, během kterých došlo k ustanovení teplotního gradientu.
- Po dokončení programu byla aparatura vypnuta od elektrického zdroje a rozebrána. Gel byl následně barven stříbrem podle postupu v kapitole 4.2.3.5.

#### 4.2.3.5. Barvení gelů stříbrem

- Pro barvení gelu TGGE byly použity 3 roztoky připravené podle postupu popsaného níže. Všechny roztoky byly připravovány vždy čerstvé do jednolitrových láhví v množství potřebném pro jedno barvení:

fixační roztok: 100 ml kyseliny octové + 900 ml ddH<sub>2</sub>O,

barvicí roztok: 1 g dusičnanu stříbrného byl přesypán do láhve a přidána ddH<sub>2</sub>O pro dosažení celkového objemu 1000 ml, roztok byl před použitím vychlazen na 4 °C,

vyvíjecí roztok I: 30 g uhličitanu sodného byl přesypán do láhve, dobře rozpuštěn ve 100 ml ddH<sub>2</sub>O a na celkový objem 1000 ml byl roztok doplněn přídavkem přidána ddH<sub>2</sub>O, roztok byl před použitím vychlazen na 4 °C,

vyvíjecí roztok II: v Erlenmayerově baňce bylo 3,14 g pentahydrátu thiosíranu sodného rozpuštěno v 10 ml ddH<sub>2</sub>O a roztok byl rovněž před použitím vychlazen na 4 °C

Pro pozdější přidání bylo připraveno 1,5 ml 37% formaldehydu.

- Z gelu byl odstraněn vrchní krycí film a gel pevně přichycený ke spodnímu filmu byl přenesen do vhodné nádoby (v našem případě čtverhranný lavor) postavené na kývačce.
- Ke gelu bylo přidáno 500 ml fixačního roztoku a gel inkubován ve fixačním roztoku tak dlouho, dokud nepřestal být viditelný vzorkový pufr v gelu, obvykle tedy zhruba 20 min.
- Gel byl promyt 3 × 2 min v ddH<sub>2</sub>O.
- Následně byl gel přenesen do barvicího roztoku, kde byl inkubován za stálého kývání po dobu 30 min.
- Zhruba 2 minuty před uplynutím této doby byl dokončen finální vyvíjecí roztok smísením vyvíjecího roztoku I s 400 µl vyvíjecího roztoku II a přidáním 1,5 ml 37% formaldehydu.
- Gel byl vyjmut z barvicího roztoku, velmi rychle opláchnut v ddH<sub>2</sub>O a okamžitě ponořen do 500 ml vyvíjecího roztoku.
- V okamžiku, kdy se začaly objevovat hnědé proužky značící obarvenou DNA ve vzorcích, byl gel přenesen do zbývajících 500 ml vyvíjecího roztoku a vyvíjen ještě zhruba 2-3 minuty, dokud nebyly viditelné všechny vzorky.
- Barvení je však potřeba přerušit o něco dříve, než dosáhne obarvení gelu požadované intenzity, jinak se neúměrně zvýší obarvení pozadí gelu. Zastavení procesu barvení

bylo provedeno přilitím zbývajících 500 ml fixačního roztoku přímo do nádoby s gelem a barvicím roztokem.

- Po cca dvou minutách byl gel opláchnut 2× 2 min v ddH<sub>2</sub>O a usušen při laboratorní teplotě.
- Obarvený a usušený gel byl vyfotografován a vyhodnocen.

#### 4.2.3.6. PCR

##### Obsah PCR reakce:

templátová DNA (desítky ng)	1 µl,
Taq polymerasa	1 µl,
„forward“ primer	1,25 µl,
„reverse“ primer	1,25 µl,
dNTPs	0,5 µl,
10× koncentrovaný PCR pufr pro Taq polymerasu	2,5 µl,
ddH <sub>2</sub> O	17,5 µl.

U negativní kontroly byl místo 1 µl templátové DNA přidán 1 µl ddH<sub>2</sub>O.

95 °C	3 min	} 30 cyklů
95 °C	30 s	
variabilně	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	do odvolání	

##### PCR reakce pro vytvoření rekombinantních fragmentů

templátová DNA (desítky ng)	1 µl,
Taq polymerasa + 5 % polymerasy Pfu	1 µl,
„forward“ primer	1,25 µl,
„reverse“ primer	1,25 µl,
dNTPs	0,5 µl,
10× koncentrovaný PCR pufr pro Taq polymerasu	2,5 µl,
ddH <sub>2</sub> O	17,5 µl.

94 °C	1 min	} 30 cyklů
94 °C	30 s	
gradient 40-60 °C	30 s	
72 °C	3,5 min	
72 °C	10 min	
4 °C	do odvolání	

### PCR reakce pro přípravu vzorků pro TGGE

templátová DNA (desítky ng)	1 µl,
Taq polymerasa	1 µl,
„forward“ primer (HCVIRESf-Sal-clamp)	1,25 µl,
„reverse“ primer (Reverse BamH1)	1,25 µl,
dNTPs	0,5 µl,
10× koncentrovaný PCR pufi pro Taq polymerasu	2,5 µl,
ddH <sub>2</sub> O	17,5 µl.

95 °C	3 min	} 25 cyklů
94 °C	30 s	
56 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
4 °C	do odvolání	

### Sekvenační PCR reakce:

Složení směsi:

templátová DNA	500 ng,
sekvenační směs	2 $\mu$ l,
sekvenační pufr	4 $\mu$ l,
primer (5 pmol)	1 $\mu$ l,
doplnit ddH <sub>2</sub> O na celkový objem 20 $\mu$ l.	

Sekvenační směs a sekvenační pufr pochází ze soupravy Big Dye™ Terminator Sequencing Kit v 3.1

Program:

96 °C	1 min	} 24 cyklů
96 °C	30 s	
variabilně	30 s	
60 °C	4 min	
4 °C	do odvolání	

Po dokončení PCR byla směs přesrážena:

- K 20  $\mu$ l PCR směsi bylo přidáno 2  $\mu$ l NaAc a 50  $\mu$ l 96% EtOH, promícháno a necháno 15 min při laboratorní teplotě.
- Vzorek byl centrifugován 20 min při 13000 g.
- Z mikrozkušavky byl odsát EtOH, precipitát byl promyt 250  $\mu$ l 70% EtOH a vzorek byl centrifugován 15 min při 13000 g.
- Z mikrozkušavky byl dokonale odsát veškerý EtOH a vzorek byl sušen cca 10 minut při 37 °C.
- Vysušený vzorek byl předán k sekvenační analýze do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK.

#### 4.2.3.7. Modifikace DNA

##### 4.2.3.7.1. Štěpení restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy stejně jako restrikční pufrы byly ze systému poskytovaného firmou Fermentas. Pro určení vhodného pufru při štěpení byly použity informace dodané výrobcem, pro štěpení kombinací dvou enzymů byla informace o nejvhodnějším restrikčním pufru získána na internetové stránce výrobce: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>.



- Běžné analytické štěpení probíhalo v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$  při složení restriční směsi  $X$   $\mu\text{l}$  DNA, 1  $\mu\text{l}$  restriční endonukleasy (RE), 0,5  $\mu\text{l}$  ribonukleasy A, 1  $\mu\text{l}$  10 $\times$  koncentrovaného restričního pufru, (10- $X$ )  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Množství DNA bylo určováno na základě předchozí elektroforesy nebo dle údajů naměřených přístrojem Nano Drop.
- Štěpení vektorů a PCR produktů dvěma restričními enzymy při konstrukci rekombinantních vektorů probíhalo v restričních směsích o složení:  
10  $\mu\text{l}$  DNA (PCR produkt), 1  $\mu\text{l}$  RE<sub>1</sub>, 1  $\mu\text{l}$  RE<sub>2</sub>, 0,3  $\mu\text{l}$  ribonukleasy A, 4  $\mu\text{l}$  10 $\times$  koncentrovaného restričního pufru, 3,7  $\mu\text{l}$  vody,  
resp. 3  $\mu\text{l}$  DNA (vektor), 1  $\mu\text{l}$  RE<sub>1</sub>, 1  $\mu\text{l}$  RE<sub>2</sub>, 0,3  $\mu\text{l}$  ribonukleasy A, 2  $\mu\text{l}$  10 $\times$  koncentrovaného restričního pufru, 2,7  $\mu\text{l}$  vody.
- Tyto restriční směsi byly inkubovány při 37 °C po dobu 3 hod.

#### 4.2.3.7.2. Defosforylace konců DNA

Vektor štěpený restriční endonukleasou byl defosforylován z důvodu zamezení jeho opětovné recirkularizace bez vloženého insertu. Použitá alkalická fosfatasa pocházející z arktických krevet *Pandalus borealis* (Fermentas) je aktivní i v přítomnosti restričních enzymů a jejich pufrů či v pufrech pro PCR reakci.

- Byla připravena reakční směs o následujícím složení:  
linearizovaná DNA izolovaná z gelu            1  $\mu\text{g}$ ,  
10 $\times$  koncentrovaný reakční pufr                2  $\mu\text{l}$ ,  
alkalická fosfatasa SAP                            1  $\mu\text{l}$ ,  
doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$ .
- Směs se vzorkem byla důkladně promíchána, krátce centrifugována a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 min při 5' přesahujících nebo tupých koncích DNA, resp. 60 min při 3' přesahujících koncích.
- Reakce byla zastavena zahřátím vzorku na 65 °C po dobu 15 min.

#### 4.2.3.7.3. Zatupení přesahujících konců molekul DNA

Zatupení přesahujících konců molekul DNA bylo provedeno pomocí Klenowova fragmentu. Ten je schopen dosyntetizovat ustupující 3' konec, nebo degradovat 3' přesahující konec DNA.

- V mikrozkuhavce byla připravena následující reakční směs:

DNA (v závislosti na koncentraci)      0,1-4 µg,

10× koncentrovaný reakční pufr  
pro Klenowův fragment      2 µl,

Klenowův fragment      2 µl,

dNTPs (každý 1,66 mM)      0,6 µl,

doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20 µl.

- Směs byla inkubována 15 min při 37 °C.
- Enzym byl teplotně inaktivován ohřátím směsi na 75 °C po dobu 10 min.
- Modifikovaná DNA byla přečištěna soupravou High Pure PCR Product Purification Kit podle postupu v kapitole 4.2.3.1.5.

#### 4.2.3.7.4. Úprava konců DNA pomocí soupravy Fast DNA End Repair Kit

Tato souprava slouží k zatupení a fosforylaci konců molekul DNA. Kombinuje trojici enzymů – T4 DNA polymerasu, Klenowův fragment a T4 polynukleotidkinasu.

- Do mikrozkuhavky inkubované na ledu byla připravena reakční směs o následujícím složení:

DNA (v závislosti na koncentraci)      0,5-5 µg,

10× koncentrovaný roztok *End Repair Reaction Mix*      5 µl,

směs enzymů *End Repair Enzyme Mix*      2,5 µl,

doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 50 µl.

- Reakční směs byla inkubována po dobu 5 min při teplotě 20 °C.
- Modifikovaná DNA byla přečištěna soupravou High Pure PCR Product Purification Kit podle postupu v kapitole 4.2.3.1.5.

#### 4.2.3.7.5. Ligace molekul DNA

- V mikrozkuhavce byla připravena následující reakční směs (u množství insertu a rozštěpeného vektoru uváděn obvyklý rozsah použitých objemů [podle koncentrace]):

insert (fragment DNA)      0,5-10 µl,

rozštěpený vektor      0,5-3 µl,

T4 DNA ligasa      2 µl,

pufr pro T4 DNA ligasu      3 µl,

doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 30 µl.

- Ligační směs byla inkubována po dobu zhruba 16 hod při 16 °C.
- Enzym byl teplotně inaktivován zahřátím směsi na 65 °C po dobu 10 min.

#### 4.2.3.8. Vnášení DNA do mikroorganismů

##### 4.2.3.8.1. Příprava elektrokompetentních buněk *E. coli*

- Exponenciálně rostoucí kultura požadovaného bakteriálního kmene byla zaočkována do vytemperovaného TY média (37 °C) na hodnotu optické denzity  $OD_{600} = 0,1$ .
- Inokulum bylo aerobně kultivováno při třepání do dosažení hodnot  $OD_{600} = 0,7-0,9$ .
- Bakteriální suspenze byla centrifugována 10 min při 2800 g a laboratorní teplotě, supernatant byl odstraněn.
- Další postup byl prováděn na ledu a všechny roztoky byly vychlazené na 4 °C; rozpis je popsán pro 50 ml bakteriální kultury:
- Peleta byla resuspendována v 50 ml ddH<sub>2</sub>O a sediment byl centrifugován 10 min při 2800 g a 4 °C.
- Peleta byla resuspendována v 25 ml ddH<sub>2</sub>O a sediment byl centrifugován 10 min při 2800 g a 4 °C.
- Peleta byla resuspendována v 20 ml 10% glycerolu a sediment byl centrifugován 10 min při 2800 g a 4 °C.
- Peleta byla resuspendována v 10 ml 10% glycerolu a sediment byl centrifugován 10 min při 2800 g a 4 °C.
- Peleta byla resuspendována v 1 ml 10% glycerolu a suspenze byla rozdělena na alikvoty (~200 µl).
- Takto připravené elektrokompetentní buňky byly uchovávány při -80 °C.

##### 4.2.3.8.2. Transformace buněk *E. coli* elektroporací

- Do vychlazené elektroporační kyvety o elektrodové vzdálenosti 2 mm byla vnesena směs 40 µl suspenze elektrokompetentních buněk *E. coli* a 1 µl vhodně naředěné DNA (asi 100 ng).
- Byl aplikován puls elektroporátorem Gene Pulser Xcell™ Total System (Bio-rad): kapacitance 25 µF, napětí 2,5 kV, odpor 200 Ω.
- Co nejrychleji po pulzu byl přidán 1 ml temperovaného 2×TY média (37 °C, bez antibiotik).
- Buněčná suspenze byla inkubována 1 hod při 37 °C za třepávání.
- Transformované buňky byly ve třech ředěních vysety na Petriho misky s agarovou půdou a příslušným antibiotikem.

#### **4.2.3.9. Vnášení DNA do tkáňových kultur**

##### **4.2.3.9.1. Transientní transfekce buněčné kultury**

Transientní transfekce buněčné kultury byla prováděna pomocí komerční soupravy TurboFect Transfection Reagent (Fermentas). DNA tvoří s reagencií TurboFect pozitivně nabitý komplex, který chrání DNA před degradací a usnadňuje její vstup do buněk. Pomocí této metody je do buněk současně vneseno mnoho kopií jednoho vektoru, jehož genetická informace je po nějakou dobu buňkou exprimována. V případě určování vlivu mutací v oblasti HCV IRES na míru translace zprostředkované IRES byly transientně transfekované buňky následně zpracovány pro analýzu na průtokovém cytometru (viz kapitolu 4.2.4.2). Pokud se jednalo o transfekci vektorů určených pro tvorbu stabilních linií, byla využita transientní transfekce buněčné kultury pro ověření správné funkčnosti těchto vektorů pozdějším měřením luciferasových aktivit (viz Kapitola 4.2.4.1.).

- Požadovaná buněčná kultura byla kultivována běžným způsobem na 10cm Petriho misce v kompletním médiu tak, aby dosáhla téměř 100% konfluence.
- Z takto připravené buněčné kultury bylo den před transfekcí odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS, bylo přidáno 12,5 ml čerstvého kompletního média a buňky byly uvolněny od povrchu Petriho misky seškrabáním do média.
- V jamkách 24jamkové destičky bylo rozpuštěno vždy 75  $\mu$ l buněčné suspenze v 500  $\mu$ l čerstvého média. Díky tomu dosáhla buněčná kultura za 24 h požadované konfluence pro transfekci 70-90 %.
- Po dosažení potřebné konfluence byly buňky transfekovány podle pokynů výrobce: do každé jamky byla přidána transfekční směs připravená rozpuštěním 1  $\mu$ g příslušné DNA ve 100  $\mu$ l Opti-MEM média spolu s 2  $\mu$ l transfekční reagentie TurboFect.
- Buňky byly kultivovány s běžným způsobem po dobu 48 hodin.
- Poté byly buňky zpracovány pro následnou analýzu způsobu popsanými v Kapitole 4.2.4.1 (Měření luciferasových aktivit) či 4.2.4.2 (Měření fluorescence průtokovou cytometrií).

##### **4.2.3.9.2. Stabilní transfekce buněčné kultury**

###### **Systémy Flp-In a Flp-In T-Rex (Invitrogen)**

Při stabilní transfekci je přímo do genomu buněk buněčné kultury vložen gen či umělý konstrukt, který je poté konstitutivně exprimován, případně je jeho exprese indukovatelná. Dojde tak k vytvoření tzv. stabilní buněčné linie. Pro tvorbu stabilních linií bylo v této práci použito systému Flp-In společnosti Invitrogen. Tento systém je

založen na principu původně kvasinkového rekombinačního systému. Savčí buněčné kultury tohoto systému mají ve svém genomu vložené tzv. FRT rekombinační místo (*Flp Recombination Target*). Sekvence tohoto místa je specificky rozpoznávána Flp rekombinase, která provádí sekvenčně specifickou rekombinaci. Pro úspěšnou rekombinaci je potřeba buňky systému Flp-In transfekovat vektorem nesoucím gen pro Flp rekombinasi (pOG44) společně s vektorem, který ve své sekvenci rovněž nese FRT rekombinační místa a navíc obsahuje vložený gen či konstrukt (pcDNA5/FRT či pcDNA5/FRT/TO, viz níže).

Použity byly buňky Flp-in 293 a Flp-In 293 T-Rex. Jedná se o buňky savčí buněčné kultury HEK293, která byla odvozena od lidských embryonálních ledvinných buněk. Do jejich genomu bylo vloženo FRT rekombinační místo. Zatímco u buněk Flp-In 293 používaných s vektorem pcDNA5/FRT dochází po vložení genu či konstrukt do jejich genomu ke konstitutivní expresi řízené promotorem lidského cytomegaloviru (CMV), buňky Flp-In 293 T-Rex používané s vektorem pcDNA5/FRT/TO umožňují po vložení genu či konstrukt do jejich genomu jeho indukovatelnou expresi. Indukce transkripce insertu probíhá přidáním tetracyklinu, neboť je exprese insertu řízena hybridním promotorem složeným z CMV promotoru a tetracyklinového operátoru TetO2.

### **Tvorba stabilních buněčných linií pomocí systémů Flp-In a Flp-In T-Rex**

- Buňky Flp-In 293 a Flp-In 293 T-Rex (Invitrogen) byly kultivovány běžným způsobem jako ostatní buněčné kultury, avšak použitá média se lišila svým složením. Média pro kultivaci těchto linií neobsahovala běžnou směs antibiotik a antimykotik, ale v případě linie Flp-In 293 phleomycin (200 µg/ml) a v případě linie Flp-In 293 T-Rex phleomycin (200 µg/ml) a blasticidin (15 µg/ml).
- Pro transfekci byly buňky kultivovány na 6cm Petriho misce do dosažení téměř 100% konfluence. Zhruba 16 hodin před vlastní transfekcí byly buňky uvolněny od povrchu přidáním 1 ml roztoku trypsinu a naředěny v 5 ml kultivačního média pro danou buněčnou linii. Z této buněčné suspenze bylo na novou 6cm Petriho misku přeneseno 1,5 ml a rozpuštěno ve 4,5 ml kultivačního média bez antibiotik.
- Po přibližně 16 hodinách dosáhly buněčná kultura zhruba 70% konfluence.
- V 590 µl Opti-MEM média bylo rozpuštěno 0,6 µg DNA (vektoru s insertem) a 5,4 µg vektoru pOG44 (kódujícího Flp rekombinasi) dodávaného společně se soupravami. K tomuto roztoku bylo přidáno 12 µl transfekčního reagens TurboFect a celý objem roztoku byl přenesen na Petriho misku s buněčnou kulturou. Po důkladném rozprostření transfekčního roztoku po ploše misky byly buňky kultivovány obvyklým způsobem.

Pro transfekci buněčné linie Flp-In 293 byl použit vektor odvozený od vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$  s příslušným insertem, pro transfekci buněčné linie Flp-In 293 T-Rex byl použit dodávaný komerční vektor pcDNA5/FRT/TO obsahující příslušný insert.

- Za 24 hod po transfekci bylo médium odsáto a nahrazeno médiem bez antibiotik.
- Za 48 hod po transfekci bylo z Petriho misky odsáto médium, buňky byly od povrchu misky uvolněny přidáním roztoku trypsinu a přeneseny na 10cm Petriho misku. Od této chvíle byly transfekované buňky linie Flp-In 293 kultivovány v médiu obsahujícím hygromycin B (200  $\mu$ g/ml) a transfekované buňky linie Flp-In 293 T-Rex v médiu obsahujícím hygromycin B (200  $\mu$ g/ml) a blasticidin (15  $\mu$ g/ml).
- Médium bylo měněno za čerstvé každé tři dny.
- Po cca třech týdnech se objevily na miskách okem viditelné kolonie buněk pocházející vždy z jedné transfekované buňky.
- V takovém případě bylo z misky odsáto médium, buňky byly opatrně opláchnuty PBS a jednotlivé kolonie byly postupně přenášeny z Petriho misky do jednotlivých jamek 96jamkové destičky. Toho bylo dosaženo nanesením malého objemu roztoku trypsinu přímo na konkrétní kolonii, její mechanické oddělení od povrchu špičkou pipetmanu, nasátím a přenesením do jamky s čerstvým médiem. Po přenesení všech kolonií bylo na tuto původní Petriho misku přidáno 12 ml čerstvého kultivačního média pro danou buněčnou linii. Následnou kultivací totiž došlo k obnovení kolonií ze zbytků nepřenesených buněk, případně vzniku nových kolonií. Takováto směs buněk z několika různých kolonií byla následně rovněž přenesena do jamky 96jamkové destičky a označena jako „polyklonální“.
- Na 96jamkové destičce byly buňky nadále kultivovány obvyklým způsobem, dokud nedosáhly konfluence kolem 100 %. Po dosažení tohoto stavu bylo z dané jamky odsáto médium a buňky byly pomocí trypsinu či mechanického seškrabání z povrchu jamky přeneseny do 5 ml čerstvého média na 6cm Petriho misce.
- Pokračující kultivací dosáhly buňky na 6cm Petriho misce konfluence blížící se 100 %. V tomto bodě byly buňky uvolněny trypsinem do 5 ml čerstvého média a z této buněčné suspenze bylo po 1 ml přeneseno na 5 nových 6cm Petriho misek a rozpuštěno v nich ve 4 ml čerstvého média.
- Po dosažení téměř 100% konfluence na všech 5 miskách byly buňky ze 4 Petriho misek použity pro vytvoření dvou konzerv podle běžného postupu popsaného v Kapitole 4.2.2.3. Buňky z páté Petriho misky byly použity pro následnou analýzu. V případě stabilní linie vytvořené na základě buněk Flp-In 293 T-Rex je potřeba minimálně 24 h

před analýzou exprese insertu indukovat expresi prostřednictvím přidání 1 µg tetracyklinu na ml kultivačního média.

#### 4.2.4. Práce s proteiny

##### 4.2.4.1. Měření luciferázových aktivit

Měření aktivity dvou různých luciferas v jednom vzorku bylo možno díky komerční soupravě Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega). Jednalo se konkrétně o luciferasu z organismu *Renilla reniformis* a luciferasu Luc2, což je luciferasa pocházející ze světlušky *Photinus pyralis*, jejíž sekvence byla upravena s cílem eliminace kryptických transkripčních míst a zvýšení exprese proteinu v savčích buňkách optimalizací použitých kodonů.

##### Příprava lyzátů

Pro účely měření luciferasových aktivit byl připraven lyzát z tkáňových kultur pomocí roztoku *Passive lysis buffer* dodávaného jako součást soupravy pro měření luciferázových aktivit Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega).

- Z transientně či stabilně transfekované buněčné kultury bylo 48 hodin po transfekci (transientní transfekce) či indukci exprese vneseného konstruktu (stabilní transfekce, buňky Flp-In 293 T-Rex) odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS.
- K buněčné kultuře bylo přidáno množství roztoku *Passive lysis buffer* podle manuálu k výše zmíněné soupravě. Buňky byly umístěny na kývačku po dobu 15 min.
- Během této doby došlo k pasivní lýze buněk a uvolnění obsahu jejich cytoplasmy do roztoku. Tato suspenze byla poté přenesena do mikrozkušavek a použita pro měření luciferázových aktivit, nebo uchována pro pozdější analýzu při -80 °C.

##### Měření luciferasových aktivit

- Buněčné lyzáty připravené podle výše popsaného postupu byly rozmrazeny na ledu, v případě přímého použití po jejich přípravě byly po celou dobu uchovávány na ledu.
- Roztok LARII byl dle návodu k soupravě připraven bezprostředně po jejím dodání rozpuštěním lyofilizovaného substrátu v příslušném pufru ze soupravy a roztoky byly až do použití uchovávány v mikrozkušavkách při -80 °C. Zhruba dvě hodiny před použitím bylo potřebné množství LARII umístěno do prostředí s laboratorní teplotou, aby došlo k roztátí roztoku a jeho vytemperování na laboratorní teplotu. Po celou dobu byl roztok LARII uchováván bez přístupu světla, aby nedocházelo k jeho degradaci.

- Roztok Stop&Glo byl připraven před použitím čerstvý dle návodu naředěním 50× koncentrovaného Stop&Glo substrátu příslušným pufrům ze soupravy na výsledný 1× koncentrovaný roztok.
- Měření každého vzorku probíhalo v triplicátu: do třech scintilačních zkumavek bylo napipetováno 40 µl roztoku LARII. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 8 µl příslušného lyzátu, rychle promícháno vortexováním a vloženo do luminometru Microlite TLX2 (Dynatech Laboratories). Měření chemoluminiscence první luciferasy, Luc2, probíhalo u každého vzorku z triplicátu po dobu 10 sekund. Poté byly zkumavky z přístroje vyjmuty a do každé z nich bylo přidáno 40 µl roztoku Stop&Glo. Ten specificky blokuje reakci katalyzovanou Luc2 luciferasou a naopak poskytuje substrát pro reakci druhé luciferasy. Zkumavky byly po přidání roztoku Stop&Glo opět krátce vortexovány a vloženy do luminometru. Měření chemiluminiscence každého vzorku z triplicátu opět probíhalo po dobu 10 sekund.
- Pokud hodnoty luminiscence dosáhly horního detekčního limitu přístroje nebo ho přesáhly, bylo nutno vzorky 100× naředit (v tomto případě byl použit 100mM draselno-fosfátový pufr o pH 7,8; obecně je třeba zvolit takový roztok, jehož složení nebude inhibovat chemoluminiscenční reakce) a naředěné vzorky opětovně změřit.
- Správnost provedení měření v rámci triplicátů byla hodnocena na základě variačního koeficientu, jehož hodnota byla určována přímo přístrojem. Variační koeficient je definován jako podíl směrodatné odchylky a absolutní hodnoty střední hodnoty. Pokud dosahovala hodnota variačního koeficientu 20 % nebo více, byla příprava triplicátu daného vzorku opakována a nově připravený triplicát byl opětovně měřen. Jelikož se jedná o velice citlivou metodu, jsou případné rozdíly mezi jednotlivými vzorky v rámci jednoho triplicátu způsobeny nejčastěji drobnými nuancemi při pipetování.

#### **4.2.4.2. Měření fluorescence průtokovou cytometrií**

- Buňky, které byly transientně transfekovány podle postupu popsaného v kapitole 4.2.3.9.1, jsem 48 hodin po transfekci opláchnul PBS a uvolnil tím od povrchu pomocí trypsinu.
- Buňky byly rozpuštěny v čerstvém médiu DMEM tak, aby jejich výsledná koncentrace byla cca 10<sup>6</sup> buněk na mililitr.
- Od každého vzorku jsem napipetoval 100 µl buněčné suspenze do jamek 96jamkové destičky. Vzorky byly měřeny pomocí průtokového cytometru LSR II (BD) a laseru Sapphire 488-20 DPSS (Coherent). Buňky byly excitovány laserovým zářením



o vlnové délce 488 nm, fluorescence emitovaná proteinem EGFP byla od zbytku spektra oddělena zařazením filtru 530/30 nm (propouštěná vlnová délka 530 nm + okolní oblast spektra o šířce 30 nm) před detektor, fluorescence emitovaná proteinem dsRED2 byla pak detekována za použití filtru 585/42 nm. Zpracování dat provedl školitel. Použit byl software FACSDiva verze 6.1.2 (BD) a FlowJo verze 7.6.1 (TreeStar).

#### **4.2.5. Programové vybavení**

- **Clone Manager** (ver. 9, Sci-Ed Software): klonování *in silico*, tvorba alignmentů
- **Chromas Lite** (ver. 2.1, Technelysium): základní analýza sekvenčních dat

## 5. Výsledky

---

### 5.1. Příprava systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů

#### IRES HCV

Jak bylo detailně probráno v literárním přehledu, nízkomolekulární látky jsou slibnou skupinou molekul, které by mohly být použity jako inhibitory translace závislé na IRES HCV. Pro prohledávání rozsáhlých knihoven je však potřeba použít vhodný systém, pomocí něhož by bylo možno vše maximálně zjednodušit. Důležitá je také dostatečná citlivost a robustnost takového systému. V této kapitole bude popsán proces, jehož prostřednictvím byly vytvořeny stabilní savčí buněčné linie, které se stanou základem právě takového systému, společně s procesem ověření správnosti a úspěšnosti jednotlivých kroků.

#### 5.1.1. Příprava vektorů nesoucích bicistronické kazety

##### 5.1.1.1. Izolace bicistronických kazet

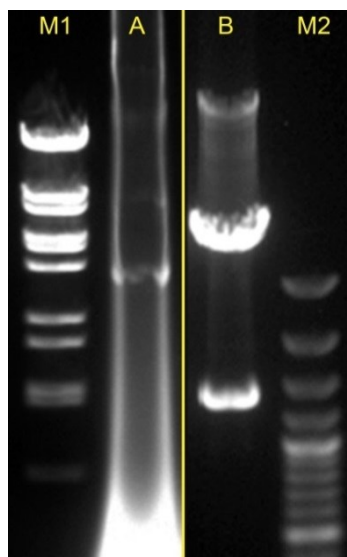
Prvotním krokem byla příprava bicistronických reportérových kazet, které byly původně součástí kvasinkových vektorů pRFh+HCV1/1 a pRFh. Tyto kazety jsou tvořeny GAL promotorem, genem pro luciferasu z organismu *Renilla* (*RLuc*), termostabilní vlásenkou tvořenou 13 CG nukleotidovými páry a 3 A tvořícími distální vlásenku, sekvencí struktury IRES HCV a pomocí ní translatovaným genem *Luc2* v případě vektoru pRFh+HCV1/1. V případě kontrolního vektoru pRFh chybí sekvence struktury IRES HCV. Tyto bicistronické kazety slouží k určování míry translace závislé na čepičce v porovnání s translací zprostředkovanou IRES HCV. Termostabilní vlásenka je mezi první cistron a IRES zařazena ve snaze zabránit ribosomu v „pročítání se“ z prvního cistronu do druhého. V případě kazety bez IRES by pak mělo teoreticky docházet k translaci pouze prvního genu.

Pomocí PCR reakcí za použití primerů RiL\_forw\_BglII a luc2Xho a vektoru pRFh nebo pRFh+HCV1/1 jakožto templátu jsem namnožil oblast od ATG kodonu genu *Rluc* po konec genu *luc2*. Pro PCR jsem použil program s teplotním gradientem v kroku nasedání primerů a na základě analýzy agarosovou elektroforézou jsem vybral ty paralely od obou vzorků, které měly nejsilnější signál. Zároveň jsem na začátku a na konci obou

produktů PCR reakce přidal pomocí zmíněných primerů restrikční místa pro restrikční endonukleasy (RE) BglII a XhoI, která jsem použil při dalším postupu.

#### **5.1.1.2. Výměna promotoru vektoru pcDNA5/FRT**

Obě kazety získané pomocí PCR, jak s IRES HCV, tak bez něj, měly být vloženy do komerčního vektoru pcDNA5/FRT/TO. Tento vektor obsahuje časný promotor lidského cytomegaloviru (CMV) regulovaný tetracyklinovým operátorem TetO2. Jak ale bylo popsáno v literatuře, je cytomegalovirový promotor v určitých savčích liniích často umlčován prostřednictvím methylocí (Teschendorf a kol., 2002; Brooks a kol., 2004). Abych se tomuto jevu vyhnul, respektive abych ho mohl na základě vlastních dat posoudit, rozhodl jsem se pro další použití připravit ještě druhý vektor. Provedl jsem modifikaci vektoru pcDNA5/FRT, který obsahuje CMV promotor bez tetracyklinové regulace, přičemž jsem jeho CMV promotor nahradil lidským promotorem EF-1 $\alpha$ . Jedná se o konstitutivní promotor alfa podjednotky eukaryotického elongačního faktoru 1. Promotor EF-1 $\alpha$  je často používaným promotorem, který se v savčích buněčných kulturách vyznačuje vysokou hladinou transkripce a nedochází k jeho umlčování (Teschendorf a kol., 2002; Qin a kol., 2010). Jako zdroj promotoru EF-1 $\alpha$  posloužil komerční vektor pEF1/myc-His A (Invitrogen). Z něj jsem sekvenci promotoru vyštěpil prostřednictvím RE BamHI a MluI. Stejnou dvojicí RE jsem štěpil i vektor pcDNA5/FRT, čímž došlo k vyštěpení původního promotoru CMV. Sekvenci promotoru EF-1 $\alpha$  jsem do rozštěpeného vektoru vložil pomocí ligace. Takto vytvořený nový vektor pcDNA5/FRT/EF-1 $\alpha$  jsem elektroporací vnesl do bakterií *E. coli* XL1 Blue a transformované bakterie jsem selektoval na agarové půdě s ampicilinem. Z náhodně vybraných 12 kolonií těchto transformovaných bakterií jsem izoloval plazmidovou DNA metodou minipreparace (Obrázek 5.1). Izolovanou plazmidovou DNA jsem pro ověření správnosti ligace štěpil RE HindIII. Toto štěpení dalo vzniknout dvěma fragmentům DNA o velikostech 1320 a 4424 bp, z nichž první obsahoval právě promotor EF-1 $\alpha$  (Obrázek 5.1). Tím byla ověřena úspěšnost konstrukce vektoru pcDNA5/FRT/EF-1 $\alpha$ .



**Obr. 5.1.: Ověření nově vytvořeného vektoru pcDNA5/FRT/EF-1α.**

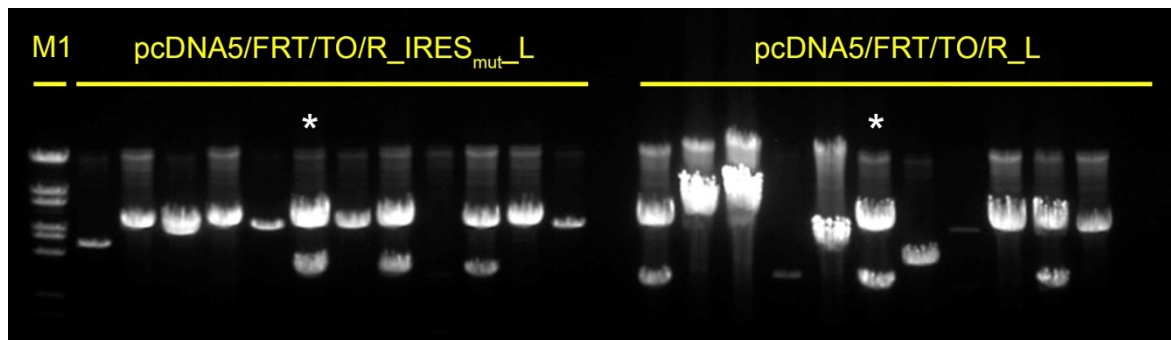
(A) Minipreparace plazmidové DNA obsahující vektor pcDNA5/FRT/EF-1α. Velikost vektoru určená klonováním *in silico* 5744 bp.

(B) Izolovaný vektor pcDNA5/FRT/EF-1α po naštěpení RE HindIII. Vznikly tak dva fragmenty, první o velikosti 1320 bp obsahující oblast promotoru EF-1α, druhý fragment o velikosti 5744 bp. Vlevo standard molekulových hmotností M1, vpravo M2.

#### 5.1.1.3. Vložení reportérových kazet do vektoru pcDNA5/FRT/TO

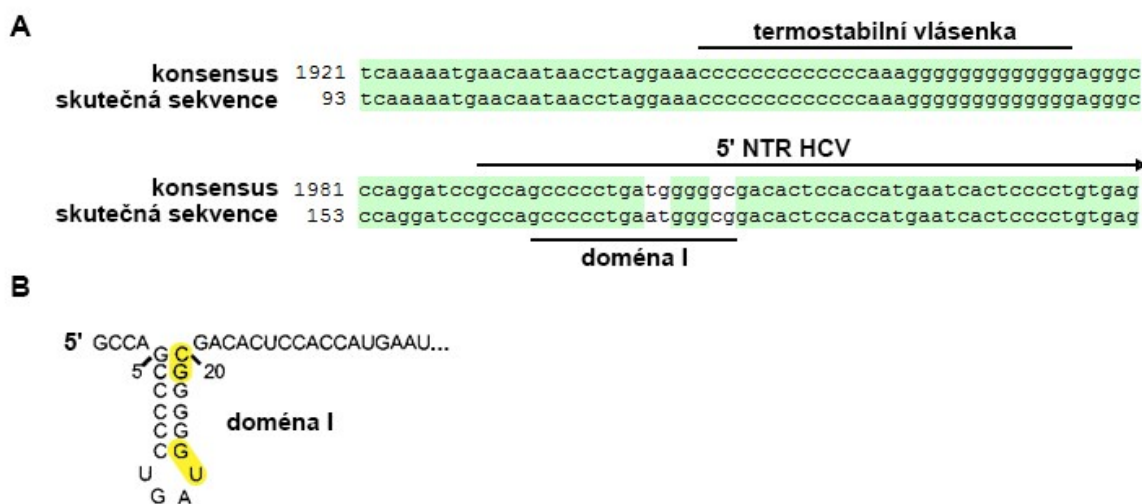
Pro konstrukci vektorů pcDNA5/FRT/TO obsahujících reportérový konstrukt s IRES HCV nebo konstrukt kontrolní jsem vektor štěpil RE BamHI a XhoI a expresní kazety amplifikované pomocí PCR jsem štěpil RE BglII a XhoI. Štěpenou DNA jsem nechal rozdělit na agarosové elektroforese, požadované fragmenty vyřízl a izoloval z gelu za pomoci soupravy FastBack DNA Minispin Kit. Enzymy BamHI a BglII vytváří komplementární konce, díky čemuž bylo možno vytvořit následnou ligací vektory pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L (obsahující kazetu s *RLuc* pod kontrolou CMV promotoru, termostabilní vlásenku, mutovaný IRES HCV [viz níže] a *Luc2*) a pcDNA5/FRT/TO/R\_L (kontrolní kazeta bez IRES HCV). Obě ligační směsi jsem použil pro transformaci buněk XL1 Blue, buňky selektoval na agarové půdě s ampicilinem, vybral náhodně po 12 koloniích pro obě ligační směsi a izoloval z nich minipreparací plazmidovou DNA. Všechny vzorky byly štěpeny RE HindIII a XhoI pro ověření úspěšnosti ligace (Obrázek 5.2). Šest pozitivních klonů (3 s kazetou s IRES, 3 s kontrolní) byly osekvenovány pomocí primerů BGH-R (sekvence *Luc2*), CMV-F (3' konec promotorové sekvence a *RLuc*), RenLuc\_3Seq (oblast termostabilní vlásenky a případně též IRES HCV) a RenLuc\_5Seq (sekvence CMV promotoru). Na základě sekvenačních dat jsem vybral po jednom klonu od obou nově připravených vektorů (označené hvězdičkou na Obrázku 5.2). Zbylé klony obsahovaly mutace či delece v oblasti termostabilní vlásenky. Bohužel jsem v sekvenci 5' NTR HCV obsaženého v dané kazetě našel dvě

dvounukleotidové mutace v oblasti domény I (Obrázek 5.3); právě z toho důvodu jsem daný vektor označil jako pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L. Přestože by zjištěné mutace neměly ovlivňovat funkčnost IRES HCV, připravil jsem variantu tohoto vektoru s opravenou sekvencí (viz Kapitola 5.1.1.5).



**Obr. 5.2.:** Vektory pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L a pcDNA5/FRT/TO/R\_L po analytickém restrikčním štěpení.

Oba vektory byly shodně štěpeny pomocí RE HindIII a XhoI. Správná velikost výsledných fragmentů DNA potvrzující úspěšné vložení reportérového konstrukt byla 3060 bp a 5063bp pro konstrukt obsahující IRES HCV a 2681bp a 5063bp pro konstrukt bez IRES. Pro sekvenaci byly vybrány vzorky pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L 6, 8 a 10 (číslováno zleva doprava) a pcDNA5/FRT/TO/R\_L 1, 6 a 10. Pro další použití byly vybrány v obou případech shodně vzorky 6, označené hvězdičkou. Zcela vlevo použitý standard M1.

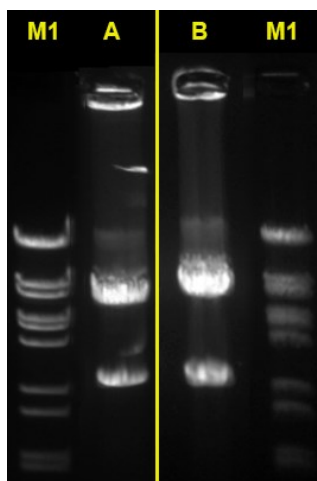


**Obr. 5.3.:** Identifikované mutace v sekvenci vektoru pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L a znázornění jejich polohy v rámci 5' NTR.

- (A) Porovnání konsensuální sekvence vektoru vytvořené klonováním *in silico* se skutečnou sekvencí vzorku 6 vektoru pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L. Znázorněna je oblast předcházející termostabilní vlásence až po oblast, kde začíná vlastní IRES HCV. Čísla vyjadřují pozici vždy prvního nukleotidu v každém řádku vztahující se k sekvenci vektoru vytvořené *in silico*, respektive k fragmentu DNA vzniklého sekvenční reakcí.
- (B) Výňatek konsensuální sekvence oblasti 5' NTR genomu HCV zobrazující jeho 5' počátek a doménu I. Žlutě jsou znázorněny nukleotidy, jejichž mutace byla pomocí sekvenace zjištěna.

#### 5.1.1.4. Vložení reportérových kazet do vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$

Ze stejných výchozích vektorů (pRFh+HCV1/1 a pRFh) jsem použil výše popsané bicistronní kazety i pro tvorbu druhé dvojice vektorů založených na mnou vytvořeném vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ . Obě kazety jsem po namnožení pomocí PCR (opět použity primery RiL\_forw\_BglIII a luc2Xho) přečistil soupravou High Pure PCR Product Purification Kit. Od tohoto kroku jsem dále postupoval čtyřmi způsoby. Varianty A a D obsahovaly kontrolní kazetu bez IRES HCV, varianty B a C byly tvořeny kazetou s IRES HCV. Varianty C a D jsem štěpil RE XhoI. Přesahující konce vytvořené RE jsem následně zatupil pomocí soupravy Fast DNA End Repair Kit (varianta C), resp. pomocí Klenowova fragmentu (varianta D). Varianty A a B jsem bez štěpení RE upravil pomocí Fast DNA End Repair Kit. Všechny čtyři varianty jsem následně přečistil pomocí soupravy High Pure PCR Product Purification Kit a štěpil RE BglIII. Naštěpené molekuly DNA všech čtyř variant jsem rozdělil podle velikosti agarosovou elektroforesou a fragmenty o správné velikosti izoloval. Vektor pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$  jsem namnožil v bakteriích kmene XL1 Blue a izoloval ho pomocí minipreparace plazmidové DNA. Takto získaný vektor jsem štěpil dvojicí RE BamHI a EcoRV. Fragmenty vektoru jsem rozdělil pomocí agarosové elektroforesy a fragment o velikosti 5709 bp jsem vyizoloval. Z 5' konců linearizovaného vektoru jsem odstranil fosfátové skupiny pomocí alkalické fosfatasy z arktických krevet (SAP). Po tomto kroku již následovala ligace linearizovaného vektoru spolu s jednotlivými variantami kazet A až D. Tyto ligační směsi jsem elektroporací vnesl do buněk XL1 Blue, které jsem následně selektoval na agarovém médiu s ampicilinem. Od všech čtyř variant jsem získal dostatečné množství bakteriálních kolonií nesoucích tyto nově vytvořené vektory. Z náhodně vybraných kolonií (12 od varianty A, 35 od B, 23 od C a 12 od D) jsem izoloval pomocí minipreparace plazmidovou DNA. Pro ověření úspěšnosti ligací jsem DNA pocházející z minipreparace všech variant vektorů štěpil dvojicí RE EcoRI a BamHI (získal jsem fragmenty DNA variant B a C o velikosti 391, 2534 a 5830 bp; u variant A a D pak fragmenty velké 12, 2534 a 5830; Obrázek 5.4) a variantu A navíc druhou dvojicí enzymů BamHI a XbaI (vznikly fragmenty o velikosti 2085, 572, 6098 bp). Pro následnou sekvenaci jsem vybral po 4 koloniích od variant A, B a C. Mezi koloniemi nesoucími variantu D se mi nepodařilo najít žádný pozitivní klon nesoucí správnou formu vektoru.



**Obr. 5.4.: Restrikce vzorků A4 a C22**

Minipreparovaná plazmidová DNA vzorků A4 (A) a C22 (B) štěpená enzymy EcoRI a BamHI. Použitý standard M1.

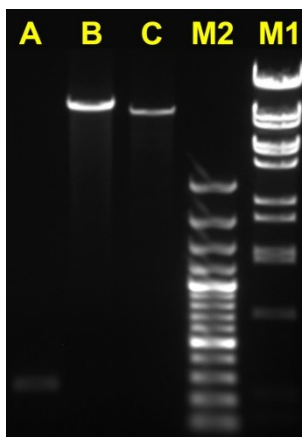
Pro sekvenování byly použity primery FLUC2seqrev (sekvenace kazety od 5' konce *Luc2* do oblasti obsahující IRES HCV [varianty B a C] a termostabilní vlásenku), RenLuc\_3Seq (oblast 3' konce *RLuc*, termostabilní vlásenky a případně IRES HCV [varianty B a C]), EF1alfa\_ForwSeq a RenLuc\_5Seq (sekvence promotoru EF1 $\alpha$  od jeho 5' konce, resp. od jeho 3' konce). Po vyhodnocení sekvenačních dat jsem vybral dva klony a to A4 a C22.

#### 5.1.1.5. Oprava mutací v sekvenci IRES HCV v bicistronických kazetách

Jak již bylo zmíněno při přípravě variant vektoru pcDNA5/FRT/TO, výchozí kazeta se sekvencí IRES HCV obsahovala dvě dvounukleotidové mutace v oblasti domény I. Tyto mutace tak byly vneseny i do vektoru založeného na pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ . Z toho důvodu jsem nově připravený vektor označil jako pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>mut</sub>\_L.

Po mnoha marných pokusech nalézt sekvenci IRES HCV bez zmíněných mutací v sekvencích několika dalších vektorů obsahujících IRES HCV jsem se rozhodl pro opravu mutací pomocí PCR a následné výměny daného úseku pomocí restrikčního štěpení a ligace. Jako templát PCR jsem použil vektor pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>mut</sub>\_L. Díky primerům HCVIRESf-SalI a HCVIRESr-BamHI jsem byl schopen amplifikovat sekvenci IRES HCV bez výše popsanych mutací, neboť prvně jmenovaný primer nasedá na oblast, ve které se tyto mutace nacházejí. Tímto způsobem jsem získal sekvenci IRES HCV bez mutací a mohl jsem ji nahradit sekvencí IRES obsahující mutace. Vektory pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>mut</sub>\_L a pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L a produkt PCR obsahující opravenou sekvenci IRES HCV jsem nejdříve nechal štěpit RE *NheI* a poté jsem přidal druhý enzym, *BamHI*. Tento postup jsem byl nucen zvolit, jelikož dané dvě RE

nemají žádný společný pufr, ve kterém by obě dostatečně dobře štěpily. Poté, co proběhlo štěpení enzymem *NheI* v 1× koncentrovaném Tango pufru, jsem přidal enzym *BamHI* a zvýšil koncentraci Tango pufru na 2× koncentrovaný. Štěpené vzorky jsem rozdělil pomocí agarosové elektroforesy a vyizoloval fragmenty odpovídající velikostem daných vektorů a fragment o velikosti 254 bp, který představoval fragment sekvence IRES HCV (Obrázek 5.5). Do obou vektorů jsem vnesl opravenou sekvenci IRES HCV pomocí ligace.

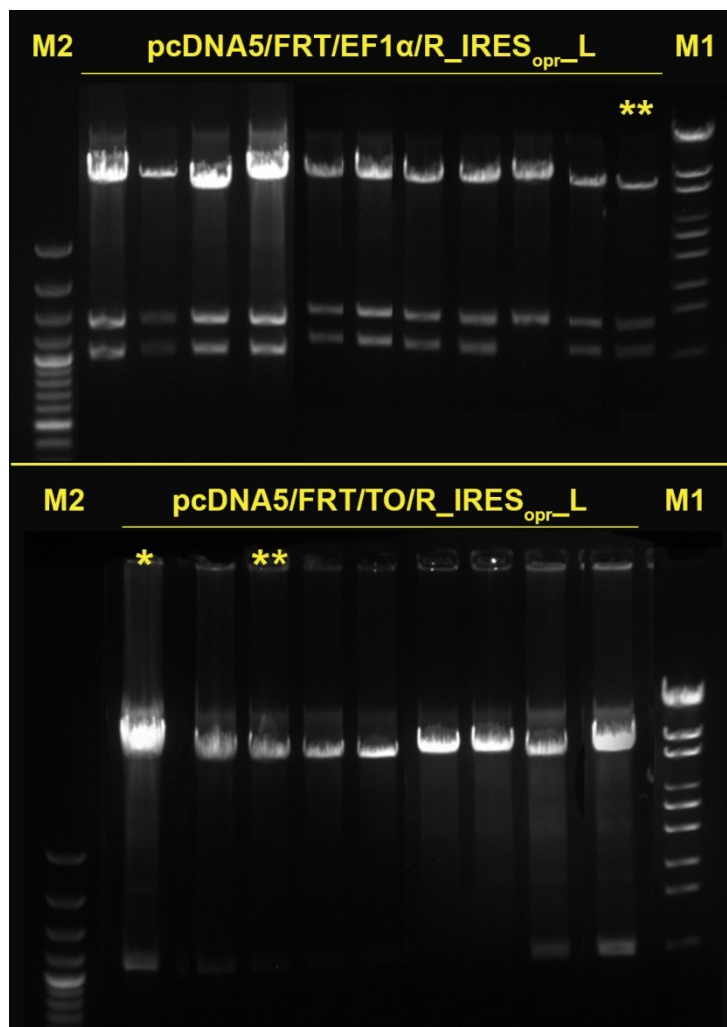


**Obr. 5.5.: Fragmenty DNA sloužící k vytvoření vektorů s opravenou sekvencí IRES HCV.**

(A) Fragment obsahující IRES HCV, (B) fragment vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>mut</sub>\_L s vyštěpenou oblastí IRES HCV, (C) fragment vektoru pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L s vyštěpenou oblastí IRES HCV. Vpravo standardy M2 a M1.

Těmito nově vytvořenými vektory pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L a pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L jsem transformoval bakterie XL1 Blue, které byly následně selektovány na agarové půdě s ampicilinem. Z 32 náhodně vybraných bakteriálních kolonií od obou vektorů jsem metodou minipreparace izoloval plazmidovou DNA a správnost ligace potvrdil restrikčním štěpením dvojicí enzymů *BamHI* a *HindIII* (vektor pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L štěpen na fragmenty o velikosti 1320, 1006 a 6429 bp, vektor pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L dal vzniknout fragmentům o velikosti 1006 a 7117 bp). Na základě štěpení jsem vybral 9 klonů nesoucích varianty vektoru pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L a 11 klonů s variantami vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L (Obrázek 5.6). Tyto vzorky byly osekvenovány pomocí primeru FLUC2seqrev. Bez mutace a současně se správnou sekvencí termostabilní vlásenky byly pouze dva vzorky vektoru pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L (pro další použití vybrán jeden z nich) a jediný vzorek vektoru pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L.





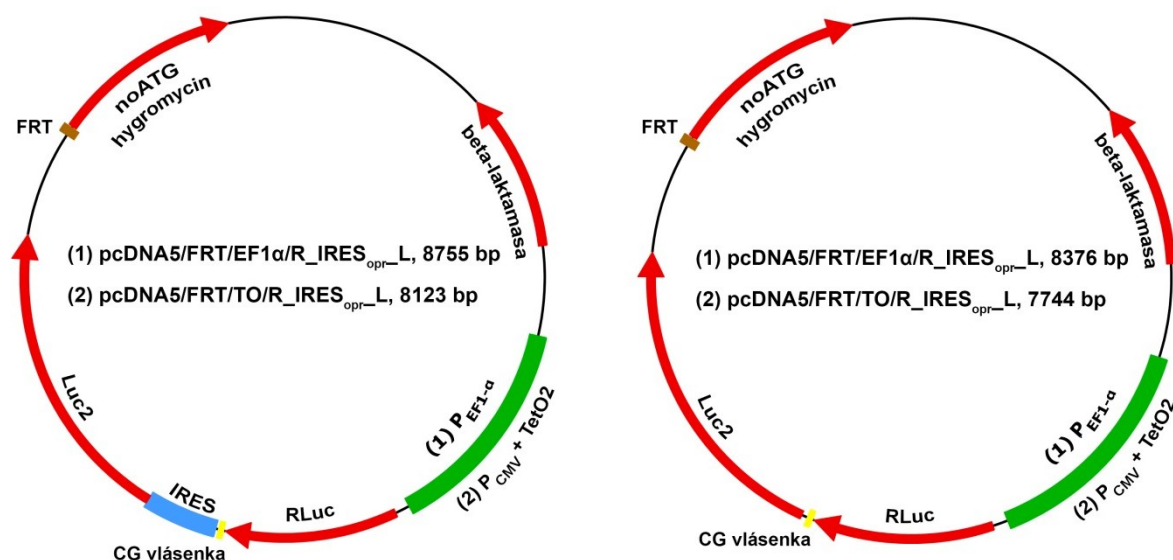
**Obr. 5.6.: Ověřovací štěpení vzorků vektorů  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha/\text{R\_IRES}_{\text{opr\_L}}$  a  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha/\text{R\_IRES}_{\text{opr\_L}}$  před sekvenováním.**

Výběr pozitivních klonů nesoucích dotyčné vektory. Vzorky označené (\*\*) byly po sekvenaci vybrány pro další použití; vzorek označený (\*) měl správnou sekvenci, ale nebyl vybrán. Použity standardy M1 a M2 dle označení.

#### 5.1.1.6. Shrnutí výsledků konstrukce nových vektorů

Z vektorů pRFh+HCV1/1 a pRFh jsem izoloval bicistronní kazety pomocí PCR.

Připravil jsem vektor  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha$  výměnou původního cytomegalovirového promotoru komerčního vektoru  $\text{pcDNA5/FRT}$  za lidský promotor EF-1 $\alpha$ . Tento vektor posloužil jako základ pro přípravu vektorů nesoucích reportérové kazety  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha/\text{R\_L}$  a  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha/\text{R\_IRES}_{\text{mut\_L}}$ . Vložением stejných dvou kazet do vektoru  $\text{pcDNA5/FRT/TO}$  vznikly varianty  $\text{pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES}_{\text{mut\_L}}$  a  $\text{pcDNA5/FRT/TO/R\_L}$ . Dvě dvoubodové mutace zjištěné v oblasti domény I 5' NTR HCV byly opraveny pomocí PCR reakce a takto vzniklý opravený fragment byl vnesen do vektorů výměnou za odpovídající část s mutacemi. Vznikly díky tomu varianty vektorů  $\text{pcDNA5/FRT/EF1}\alpha/\text{R\_IRES}_{\text{opr\_L}}$  a  $\text{pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES}_{\text{opr\_L}}$ . Přehled viz Obrázek 5.7.



**Obr. 5.7.: Přehled vytvořených vektorů nesoucích bicistronické kazety.**

Vlevo dvě varianty vektorů nesoucích bicistronickou kazetu obsahující IRES HCV. Vpravo dvě varianty vektorů nesoucích kontrolní bicistronickou kazetu bez IRES. Vektory ve dvojicích podle stavby bicistronické kazety se vždy skládaly ze stejných prvků, lišil se pouze promotor: varianty označené jako (1) obsahovaly lidský promotor EF-1 $\alpha$ , varianty (2) časný cytomegalovirový promotor. FRT - rekombinační místo rozpoznávané Flp rekombinase; noATG hygromycin - gen pro odolnost vůči hygromycinu bez iniciačního kodonu; beta-laktamasa - gen zajišťující odolnost vůči beta-laktamovým antibiotikům při vnesení vektoru do bakterií.

### 5.1.2. Transientní transfekce savčích buněčných linií nově připravenými vektory

Před přistoupením k tvorbě stabilních buněčných linií jsem nejdříve provedl transientní transfekci vybraných savčích buněčných linií. Tento krok měl za úkol ověření funkčnosti připravených vektorů a zvláště jimi nesených reportérových kazet. Mimo to jsem díky použití tří různých buněčných linií mohl porovnat funkčnost translace zprostředkované IRES HCV v závislosti na použité buněčné linii.

Savčí buněčné linie Huh-7, HEK 293T a CCL13 jsem transientně transfekoval dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3.9.1 všemi šesti mnou připravenými vektory (tedy vektorem pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr\_L</sub> a variantami -/R\_IRES<sub>mut\_L</sub> a -/R\_L; a pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr\_L</sub> a variantami -/R\_IRES<sub>mut\_L</sub> a -/R\_L). Z buněk jsem následně připravil lyzáty a v těchto vzorcích jsem měřil aktivity obou luciferas dle postupu popsáno v kapitole 4.2.4.1. V případě buněčných linií HEK 293T a CCL13 jsem pokus provedl ve třech biologických opakováních, která jsou v tabulkách i grafech vyznačeny římskými číslicemi I-III.

Získaná data přímo z luminometru sumarizuje Tabulka 5.1 včetně údajů naměřených pro netransfekované buňky. Ty sloužily jako hodnota aktivity „pozadí“. Pro snazší orientaci a vyšší názornost jsem data převedl do podoby poměru hodnot aktivit luciferas. Výsledná čísla vyjadřující kolika procent aktivity luciferasy kódované genem RLuc dosahovala aktivita luciferasy kódované genem Luc2. Jinak řečeno, kolika procent míry translace závislé na čepičce dosahovala v daném vzorku translace zprostředkovaná IRES HCV. Tato data jsou uvedena v Tabulce 5.2 a graficky prezentována na Obrázcích 5.8, 5.9 a 5.10. Kvůli značně rozdílným velikostem hodnot jsem použil pro grafy logaritmické měřítko os Y.

Na základě těchto dat je možno říci, že vektory se podařilo vektory vnést do savčích buněčných linií, reportérové geny se v buňkách exprimují a jsou funkční. Rovněž funkce termostabilní vlásenky byla potvrzena a ověřil jsem, že množství produktu genu Luc2 je závislé na přítomnosti IRES HCV.

Tab. 5.1: Změřené hodnoty aktivit luciferas v závislosti na použitém vektoru a buněčné linii při transientní transfekci.

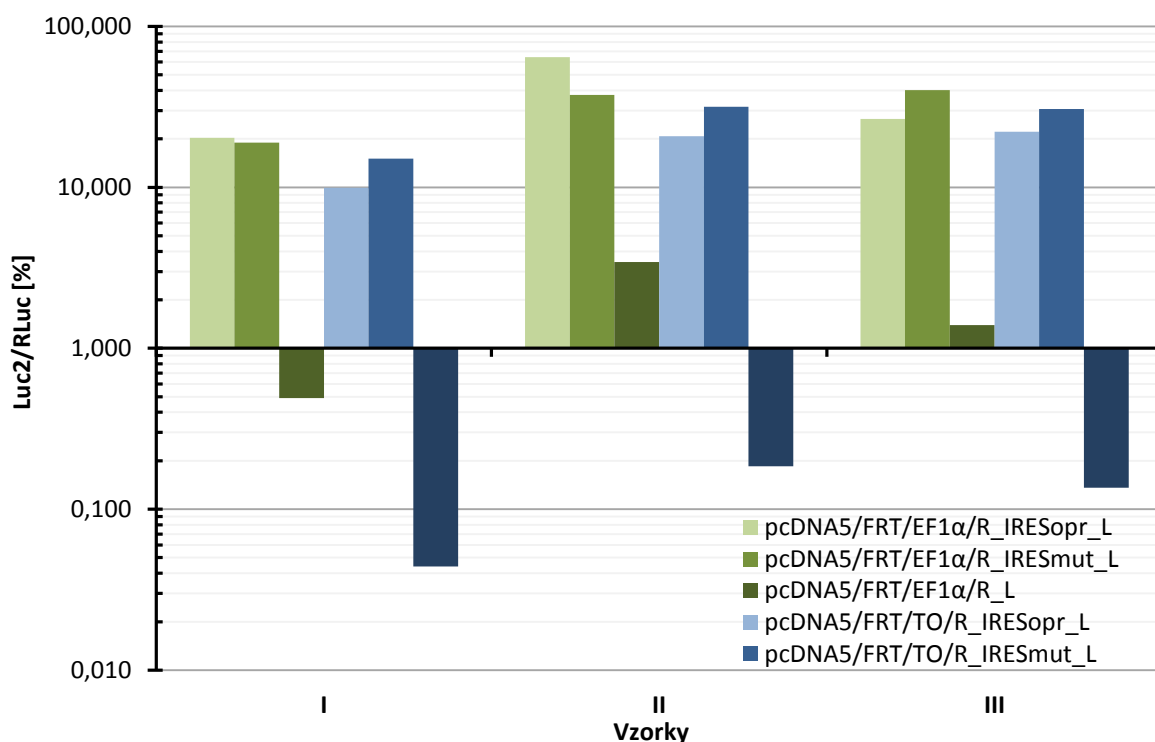
Tabulka sumarizuje výsledky měření luciferasových aktivit. Jedná se přímo o průměr tří hodnot, které byly dle popsané metodologie naměřeny luminometrem. V případě jedné značně odchylené hodnoty byla tato vyškrtnuta. Hodnoty jsou rozděleny podle použitého vektoru a buněčné linie, která byla daným vektorem transientně transfekována. Římské číslice označují biologická opakování pokusu za použitý dané buněčné linie a daného vektoru. Hodnoty označené (\*) pochází z měření, kdy byl původní buněčný lyzát 100× ředěn.

vektor použitý pro transientní transfekci	biologické opakování	Buněčná linie					
		HEK 293T		Huh-7		CCL13	
		RLuc	Luc2	RLuc	Luc2	RLuc	Luc2
<b>pcDNA5/FRT/EF1α/ R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	I	4 304 670*	875 038*	140 823*	5 766*	61 360	189 881
	II	108 682*	69 933*			4 156 783	622 349
	III	4 887 235*	1 297 261*			31 466	72 842
<b>pcDNA5/FRT/EF1α/ R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	I	4 354 258*	827 018*	3 418 023*	235 224*	3 079 240	6 651 125
	II	174 038*	65 404*			4 590 185	5 701 961
	III	3 512 543*	1 412 087*			45 313	320 250
<b>pcDNA5/FRT/EF1α/ R_L</b>	I	3 051 765*	303 838*	1 351 593*	1 859*	250 441	62 716
	II	3 684 256*	126 490*			4 449 831	91 666
	III	3 620 967*	50 504*			2 377	641
<b>pcDNA5/FRT/TO/ R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	I	3 051 765*	303 838*	25 526*	1 043*	5 775	3 009
	II	5 347*	1 111*			13 088 461	10 889 628
	III	2 067 917*	458 177*			5 388 368	6 996 923
<b>pcDNA5/FRT/TO/ R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	I	2 662 429*	401 637*	972 599*	66 678*	5 452 096	10 737 288
	II	11 986*	3 786*			13 863 441	13 490 054
	III	2 077 728*	637 258*			102 041	320 351
<b>pcDNA5/FRT/TO/ R_L</b>	I	3 475 542*	1 540*	1 777 998*	1 077*	3 301 125	113 297
	II	2 339 650*	4 320*			14 512 858	201 789
	III	2 245 359*	3 060*			20 941	403
<b>netransfekované buňky</b>	I	141	237	1751	5426	109	167
	II	133	230				
	III	131	233				

**Tab. 5.2: Procentuální poměr aktivit luciferas v závislosti na použitém vektoru a buněčné linii při transientní transfekci.**

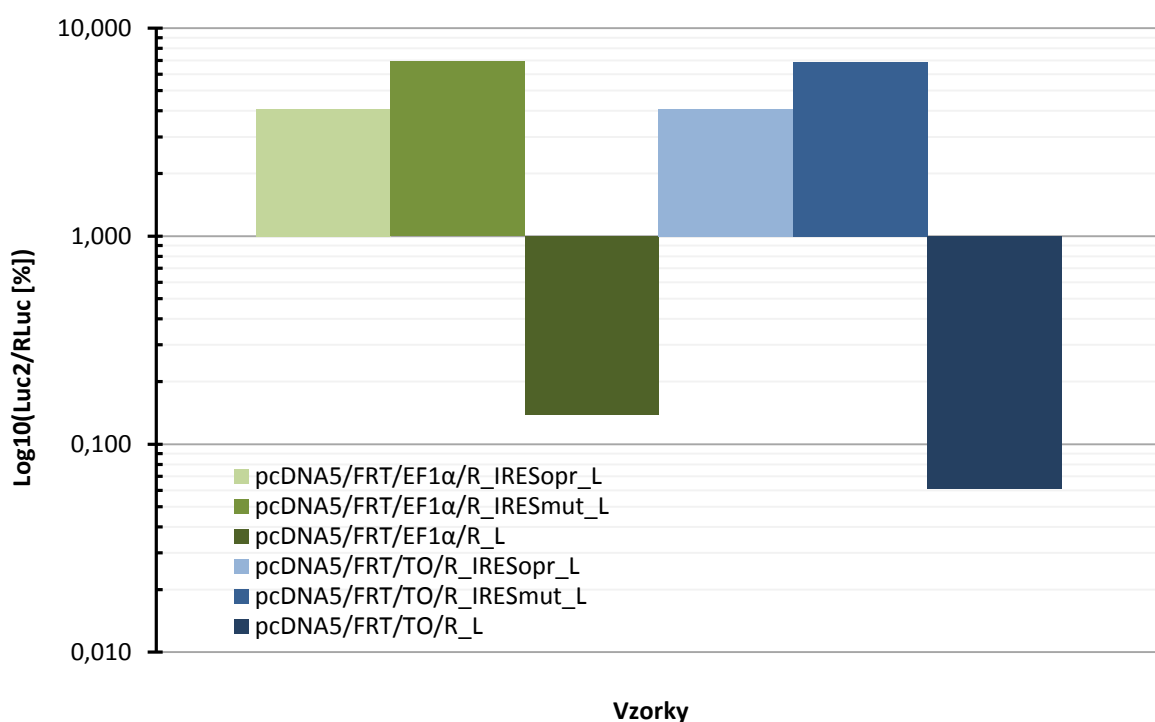
Tabulka sumarizuje výsledky měření luciferasových aktivit prostřednictvím procentuálních poměrů luciferas v jednotlivých vzorcích. Každá hodnota byla vypočtena vždy jako poměr naměřené aktivity Luc2 a aktivity RLuc, který byl vynásoben stem pro vyjádření v procentech. Hodnoty v podstatě určují, kolika procent míry translace závislé na čepičce dosahovala v daném vzorku translace zprostředkovaná IRES HCV. Římskými číslicemi jsou označena biologická opakování za použití dané buněčné linie a daného vektoru.

vektor použitý pro transientní transfekci	biologické opakování	Buněčná linie		
		HEK 293T	Huh-7	CCL13
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/</b> <b>R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	I	20,328	4,095	309,453
	II	64,346		14,972
	III	26,544		231,493
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/</b> <b>R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	I	18,993	6,882	215,999
	II	37,580		124,221
	III	40,201		706,750
<b>pcDNA5/FRT/EF1<math>\alpha</math>/</b> <b>R_L</b>	I	0,490	0,138	25,042
	II	3,433		2,060
	III	1,395		26,977
<b>pcDNA5/FRT/TO/</b> <b>R_IRES<sub>opr</sub>_L</b>	I	9,956	4,086	52,104
	II	20,778		83,200
	III	22,156		129,852
<b>pcDNA5/FRT/TO/</b> <b>R_IRES<sub>mut</sub>_L</b>	I	15,085	6,856	196,939
	II	31,586		97,307
	III	30,671		313,945
<b>pcDNA5/FRT/TO/</b> <b>R_L</b>	I	0,044	0,061	3,432
	II	0,185		1,390
	III	0,136		1,926



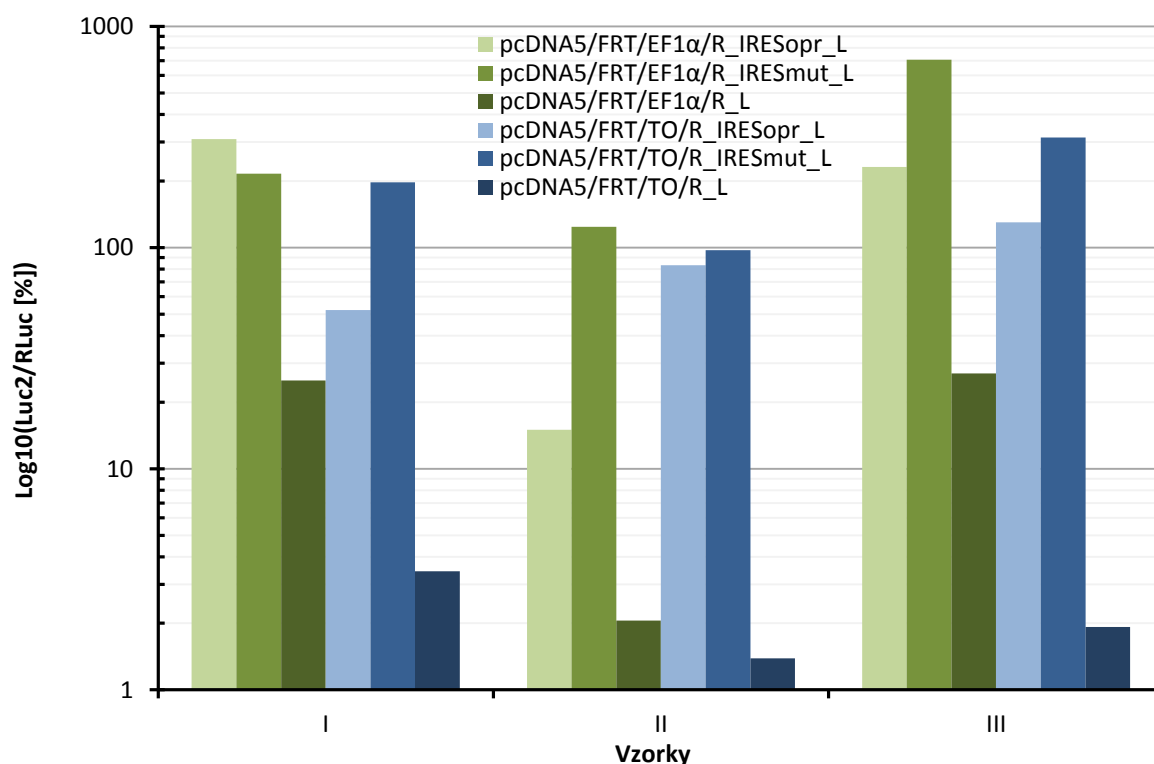
**Obr. 5.8.: Hodnoty poměru exprese reportérových genů Luc2 ku RLuc v transientně transfekované buněčné linii HEK 293T v závislosti na konkrétním vektoru.**

Na ose Y jsou vyneseny hodnoty poměru exprese genu Luc2 (translace zprostředkovaná IRES HCV) a RLuc (translace závislá na čepičce) vyjádřené v procentech na logaritmické škále při základu logaritmu 10 pro větší grafickou názornost. Římskými číslicemi jsou na ose X označena biologická opakování. Jednotlivé vektory jsou odlišeny barevně, klíč se nachází v legendě grafu.



**Obr. 5.9.: Hodnoty poměru exprese reportérových genů Luc2 ku RLuc v transientně transfekované buněčné linii Huh-7 v závislosti na konkrétním vektoru.**

Pouze jedno biologické opakování Pro další detaily viz popis obrázku 5.8.



**Obr. 5.10.:** Hodnoty poměru exprese reportérových genů Luc2 ku RLuc v transientně transfekované buněčné linii CCL13 v závislosti na konkrétním vektoru.

Pro další detaily viz popis obrázku 5.8.

### 5.1.3. Savčí buněčné linie stabilně transfekované nově připravenými vektory

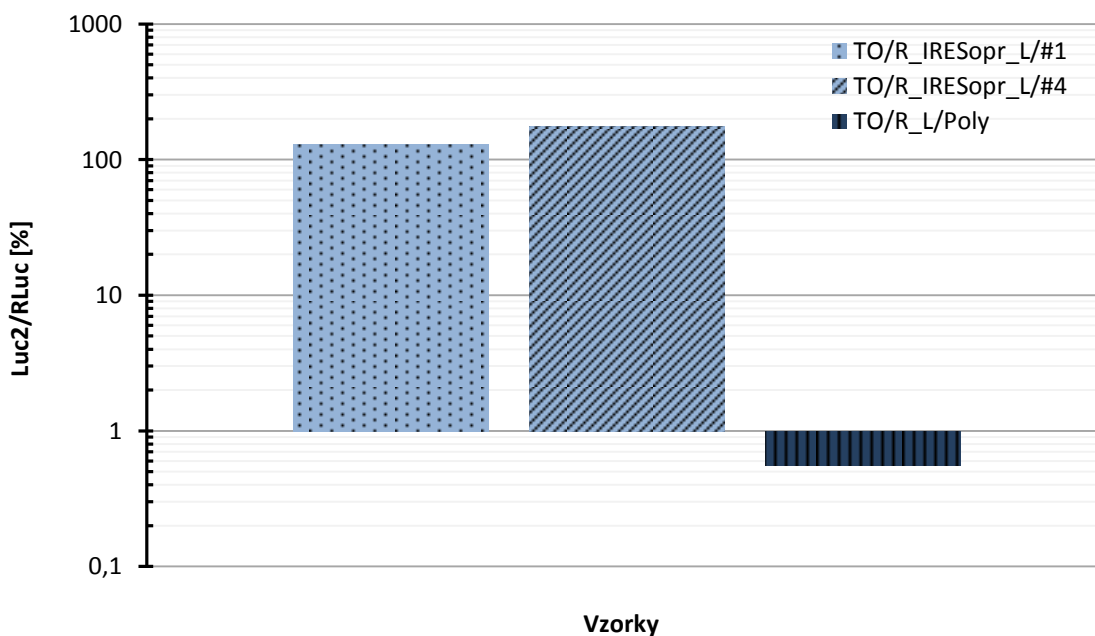
Zatímco při transientní transfekci je do buněk vneseno současně velké množství kopií molekuly vektoru a míra exprese reportérových genů je ovlivněna mimo jiné i správností provedení transfekce, při stabilní transfekci je vytvořena buněčná linie, která obsahuje většinou pouze jednu kopii reportérového konstrukt, který je stabilně integrován do jejího genomu. Proto jsem po ověření funkčnosti a charakteristik vytvořených vektorů přešel k tvorbě stabilních linií. Buňky Flp-In 293 posloužily jako základ stabilních linií, do jejichž genomu byly vneseny reportérové konstrukty pomocí vektorů pcDNA5/FRT/EF1α/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L a ...EF1α/R\_L. Stabilní linie založené na buňkách Flp-In 293 T-Rex byly vytvořeny vnesením kazet z vektorů pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L a ...TO/R\_L. Při tvorbě a ustavování stabilních linií jsem postupoval dle kapitoly 4.2.3.9.2. Vzhledem k časové náročnosti a nízké výtěžnosti tvorby stabilních linií jsem izoloval a nadále odděleně kultivoval vždy několik klonů jedné linie označených arabskými číslicemi. Směs všech úspěšně stabilně transfekovaných buněk vzniklých při přípravě jedné linie jsem po separaci jednotlivých kolonií z 10cm Petriho misky uvolnil do roztoku a nadále kultivoval pod označením takové varianty linie jako „polyklonální“. V době dokončení této diplomové práce byly úspěšně ustaveny stabilní

linie založené na buňkách Flp-In 293 T-Rex, z nichž tři varianty byly analyzovány. Hodnoty aktivit luciferas byly měřeny (kapitola 4.2.4.1) a vyhodnoceny stejně jako v případě transientní transfekce buněčných kultur v předcházející kapitole. Lyzáty pro analýzu byly připraveny z buněk Flp-In 293 T-Rex stabilních linií TO/R\_L/Poly a TO/R\_IRES<sub>opr\_L</sub>/#1 a TO/R\_IRES<sub>opr\_L</sub>/#4, které byly 48 hodin s tetracyklinem z důvodu indukce exprese reportérové kazety. Hodnoty luciferasových aktivit v těchto vzorcích stejně jako poměr Luc2/RLuc souhrnně prezentuje Tabulka 5.3. Grafické vyjádření tohoto poměru je pak znázorněno na Obrázku 5.11.

**Tab. 5.3.: Hodnoty luciferasových aktivit a jejich procentuální poměr.**

Tabulka uvádí aktivity obou luciferas ve třech různých variantách stabilních buněčných linií založených na buňkách Flp-In 293 T-Rex. RLU označuje relativní světelné jednotky. Poslední sloupec pak udává procentuální poměr Luc2 ku RLuc vyjadřující jaké míry aktivity RLuc s translací závislou na čepičce dosáhla Luc2, jejíž translace je zprostředkována IRES HCV.

varianta stabilní buněčné linie	RLuc [RLU]	Luc2 [RLU]	Luc2/RLuc [%]
TO/R_IRES <sub>opr_L</sub> /#1	5 388 368	6 996 923	129,852
TO/R_IRES <sub>opr_L</sub> /#4	4 034 522	7 126 795	176,644
TO/R_L/Poly	3 551 391	19 767	0,557



**Obr. 5.11.: Hodnoty poměru exprese reportérových genů Luc2 a RLuc ve stabilně transfekované buněčné linii Flp-In 293 T-Rex v závislosti na konkrétním klonu.**

Na ose Y jsou vyneseny hodnoty poměru exprese genu Luc2 (translace zprostředkována IRES HCV) ku RLuc (translace závislá na čepičce) vyjádřené v procentech na logaritmické škále při základu logaritmu 10 pro větší grafickou názornost. Jednotlivé klony stabilních linií jsou odlišeny barevně, klíč se nachází v legendě grafu.



Vzhledem k obtížím při přípravě stabilních linií založených na buňkách Flp-In 293 s vnesenými reportérovými kazetami EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L a EF1 $\alpha$ /R\_L byla jejich příprava opožděna. Ačkoliv jsem již vyseletoval buňky odolné vůči příslušnému antibiotiku v médiu (tj. hygromycinu) a zdá se tedy, že došlo k stabilní transformaci buněčné linie vektory, nebylo prozatím možné získané buňky analyzovat.

#### 5.1.4. Shrnutí

Z prezentovaných dat je zřejmé, že doposud vytvořené a analyzované stabilní linie opravdu produkují funkční proteiny reportérových genů. Relativní množství proteinů RLuc a Luc2 je podle naměřených luciferasových aktivit dostatečně velké, což je důležité pro použití stabilně transfekovaných buněk jakožto systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV.

## 5.2. Hledání a studium mutací IRES HCV ve vzorcích od pacientů

Jak bylo již zmíněno v literárním přehledu, sekvence IRES HCV je značně konzervovaná a mutace v této části virového genomu vedou k ovlivnění sekundární a terciální struktury RNA. To má za následek téměř vždy sníženou efektivitu iniciace translace a replikace viru. Přesto je možné nalézt ve vzorcích RNA HCV izolovaných z pacientů trpících hepatitidou C sekvence s mutacemi v oblasti IRES. V důsledku selekčního tlaku se často virus snaží zmírnit jejich negativní dopad tzv. kompenzačními mutacemi, kdy dojde k náhradě báze, která původně párovala s mutovanou bází, za takovou, aby byla pokud možno opět obnovena jejich vazba a struktura daného úseku.

Naše laboratoř disponuje neinfekčními vzorky od pacientů s hepatitidou C, které obsahují oblast IRES HCV. Prohledáváním pomocí níže popsanych postupů bylo možno nalézt mnoho různých mutací v IRES HCV. Ty byly následně studovány a byl popsán jejich vliv na změnu translace zprostředkované takto mutovanými sekvencemi IRES HCV.

Na tématu jsem spolupracoval s kolegou Anasem Khawajou, M.Sc., který se tímto tématem zabýval již přede mnou a který analyzoval množství vzorků a našel řadu mutací. Moje uspořádání experimentu bylo totožné s jeho postupem, rozdíl byl však v přípravě vzorků. Zatímco Anas používal pro namnožení sekvencí IRES HCV polymerasu *Pfu* s opravnou aktivitou, aby nedocházelo k umělému zanášení mutací do vzorků, já jsem pro tento účel používal běžnou *Taq* polymerasu. U této polymerasy bylo popsáno, že může díky své chybovosti uměle zanášet mutace do vzorků při práci s genomy RNA virů

(Bracho a kol., 1998). Naším cílem tak bylo jednak analyzovat nalezené mutace v IRES HCV ve vztahu ke změnám v míře iniciace translace zprostředkované IRES, jednak pokusit se objasnit, zda je či není použití *Taq* polymerasy při přípravě takovýchto vzorků vhodné.

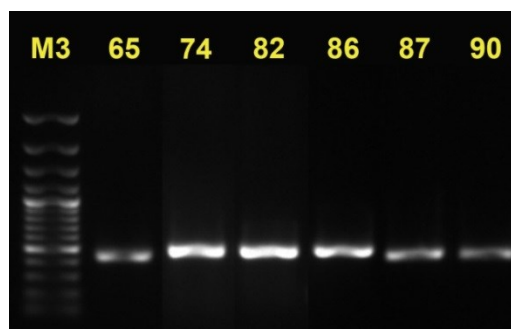
### **5.2.1. Vložení vzorků IRES HCV od pacientů do vektoru pRG**

Pro mou další práci byl vybrán vzorek 6 od pacienta č. 4 (interní označení jednotlivých vzorků). Původní kompletní genomová RNA HCV byla přepsána do cDNA za pomoci soupravy SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Tato část byla provedena ve Státním zdravotním ústavu Ostrava. Molekuly cDNA jsem použil jako templát pro PCR reakci za použití primerů HCVIRESf-SalI a HCVIRESr-BamHI. Díky restrikčním místům na konci obou primerů jsem byl schopen vložit fragmenty DNA obsahující IRES HCV do vektoru pRG za pomoci restrikce enzymy SalI a BamHI a následné ligace. Vznikly tak varianty vektoru pRG nesoucí různé sekvence IRES HCV izolované ze vzorku od pacienta č. 4. Zatímco první cistron vektoru pRG obsahuje gen pro červený fluorescenční protein dsRED2 pod kontrolou časného cytomegalovirového promotoru, druhý cistron, který následuje po IRES HCV, obsahuje gen pro zelený fluorescenční protein EGFP2 pod kontrolou IRES HCV. V obou dvou případech se jedná o vylepšené varianty původních fluorescenčních proteinů.

### **5.2.2. Příprava vzorků pro gelovou elektroforesu v teplotním gradientu.**

Varianty vektoru pRG nesoucí různé sekvence IRES HCV izolované ze vzorku od pacienta č. 4 jsem použil pro transformaci buněk *E. coli* XL1 Blue. Bakterie jsem následně selektoval na agarové půdě s kanamycinem, neboť vektor pRG nese gen zajišťující odolnost vůči tomuto antibiotiku. Z pozitivních kolonií jsem izoloval plazmidovou DNA pomocí minipreparace a analyzoval ji na agarosovém gelu. Na jejím základě jsem vybral 96 klonů, které nesly vektor přibližně správné velikosti (5802 bp), a plazmidovou DNA z těchto klonů jsem použil jako templáty pro PCR reakci. Vzorky pro analýzu pomocí elektroforesy v teplotním gradientu (TGGE) jsem připravil pomocí PCR reakce s primery HCVIRESf-Sal-clamp a Reverse BamHI. Prostřednictvím prvního z nich byla ke vzorku přidána tzv. GC svorka, tedy dlouhý úsek bohatý na GC nukleotidové páry, která díky své vysoké teplotě tání zabraňuje kompletní denaturaci vzorku během dělení v teplotním gradientu TGGE. Takto připravené vzorky obsahující IRES HCV

s GC svorkou jsem analyzoval pomocí agarosové elektroforesy. Pro další použití jsem vybral 26 vzorků, kde došlo k amplifikaci a které měly správnou délku (Obrázek 5.12)

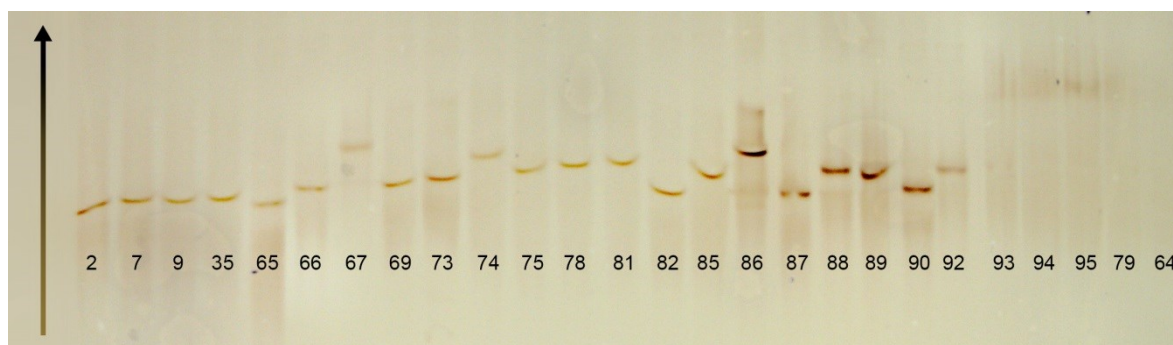


**Obr. 5.12.: Vzorky DNA obsahující sekvenci IRES HCV s přidanou GC svorkou.**

Zobrazeny jsou vzorky, které byly po TGGE použity pro transfekci buněk buněčné linie CCL13 a analýzu na průtokovém cytometru. Použitý standard M3.

### 5.2.3. Analýza vzorků pomocí gelové elektroforesy v teplotním gradientu

Gelová elektroforeza v teplotním gradientu byla s vybranými a náležitě připravenými vzorky provedena dle postupu popsaného v kapitole 4.2.3.4. Výsledkem byl gel zobrazený na Obrázku 5.13. Teoreticky by bylo možno proložit přímkou kolmou na směr dělení vzorků všemi vzorky, které mají shodnou sekvenci. Kvůli poněkud nerovnoměrné separaci vzorků bylo možno z tohoto gelu určit pouze rámcově, které vzorky obsahují mutace v sekvenci IRES HCV.



**Obr. 5.13.: Výsledek dělení vzorků pomocí gelové elektroforesy v teplotním gradientu.**

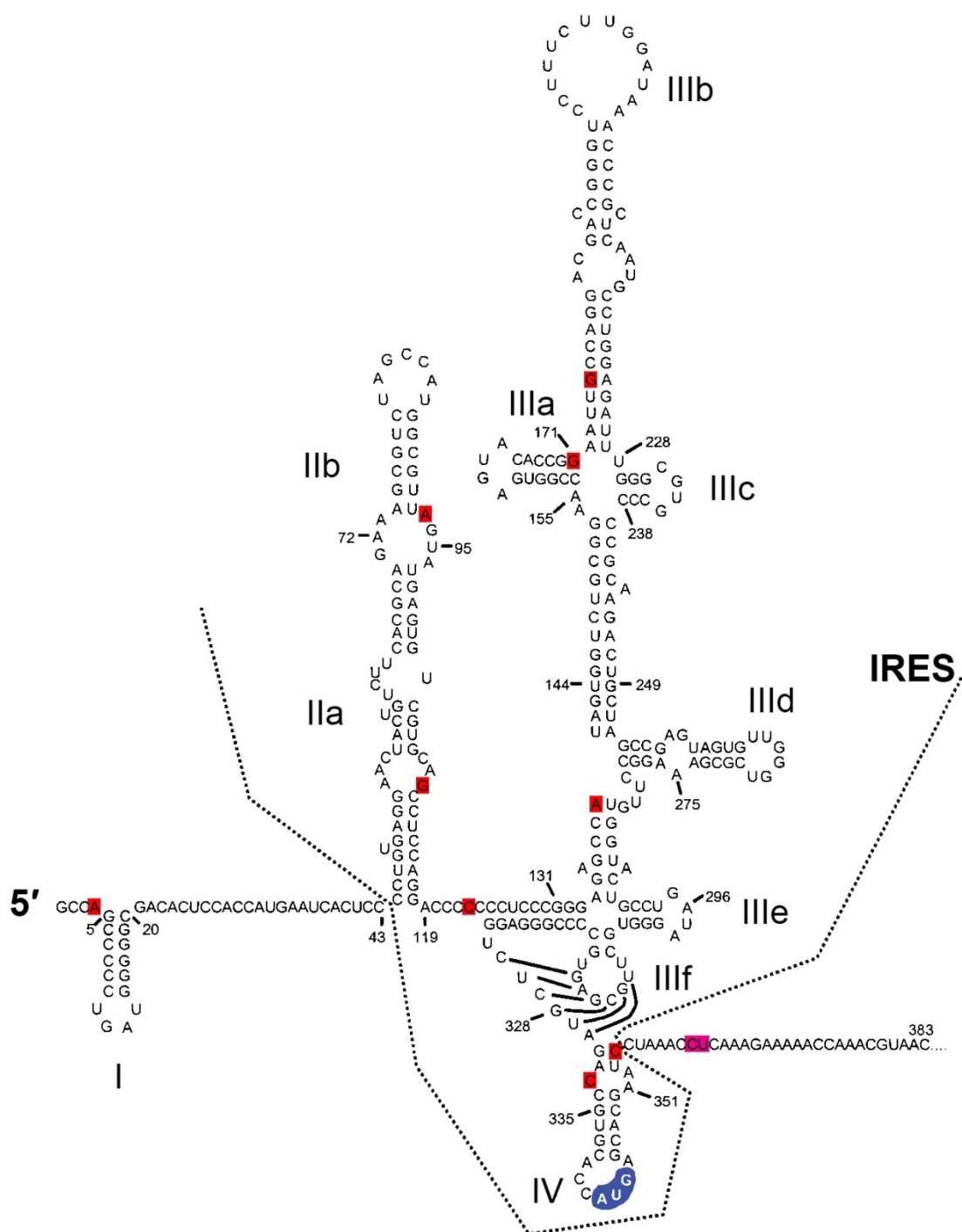
Vzorky putovaly ve směru naznačeném šipkou. Stejným směrem se rovněž zvyšovala teplota gradientu.

Vzhledem k výsledku analýzy pomocí TGGE jsem vybral k sekvenaci všechny vzorky v rozmezí od vzorku 2 po vzorek 92. Pro sekvenaci byl použit primer DsRedSeqPrimer, který pokrývá sekvenci mezi geny dsRED2 a EGFP2, která obsahuje právě IRES HCV. Data získaná sekvenací jsem srovnal pod sebe a porovnal se vzorovou sekvencí IRES HCV 1a v podobě *multialignmentu* (viz Příloha 1). Ukázalo se, že vzorky skutečně obsahují několik mutací. Jejich pozice v rámci sekundární struktury IRES HCV je vyznačena na Obrázku 5.14. Souhrnně tyto mutace prezentuje Tabulka 5.4.

**Tab. 5.4.: Přehled nalezených mutací a delecí sekvenční IRES HCV ve vzorku od pacienta a jejich poloha v rámci sekundární struktury IRES.**

Mutace jsou značeny v pořadí: původní báze, její pořadí v rámci sekvenční IRES HCV 1a a báze nově zařazené. Delece je značena symbolem delta místo báze. Číslem je určeno, ve kterém vzorku byla mutace či delece IRES HCV nalezena.

Mutace	Vzorek č.	Lokalizace mutace a její možné dopady na IRES HCV
<b>A4C</b>	2, 65, 66, 69, 73, 74, 75, 78, 81, 82, 85, 86, 87, 89, 90, 92	Oblast, na kterou nasedá 3' konec primer. Mutace pravděpodobně vnesena PCR.
<b>A4G</b>	35	
<b>A93G</b>	86	Vnitřní smyčka subdomény IIb obsahující <i>loop E</i> motiv.
<b>G110A</b>	65	Vnitřní smyčka subdomény IIa. Báze, se kterou tvoří benzimidazolové deriváty vodíkovou vazbu a která tím umožňuje jejich vazbu do oblasti této smyčky. Je predikováno, že se do této oblasti váže i hypotetický protein mající za úkol změnu topologie domény II po vazbě 40S ribosomální podjednotky.
<b>C123T</b>	90	Oblast mezi doménami II a III. Báze C123 je lokalizovaná dvě báze před oblastí podílející se na tvorbě ramena II pseudouzlu.
<b>A140G</b>	74	Bazální část domény III. Báze A140 se nachází dvě báze před A142, který podle predikcí páruje s bází U251.
<b>G171A</b>	87	Bazální část subdomény IIIa. Báze G171 je v bezprostředním sousedství bází, které tvoří křížové spojení IIIabc.
<b>G176A</b>	82	Bazální část vlásenky subdomény IIIb. Báze G176 páruje s bází A223. V případě nalezené mutace tak zřejmě dochází k rozrušení vlásenkové struktury, neboť vazba páru AA je v několika variantách sice možná, ale vyžaduje ne zcela obvyklou geometrii bází.
<b>C333T</b>	87	Vnitřní smyčka domény IV. Báze G333 leží v blízkosti oblasti, která se účastí tvorby pseudouzlu.
<b>C354T</b>	88	Bazální oblast domény IV. Báze C354 páruje s bází G331, která je v blízkosti oblasti, která se účastí tvorby pseudouzlu. Porušením párování by mohlo docházet ke zvětšení vnitřní smyčky domény IV.
<b>C361Δ T362 Δ</b>	82	Dvounukleotidová delece v úvodu otevřeného čtecího rámce.



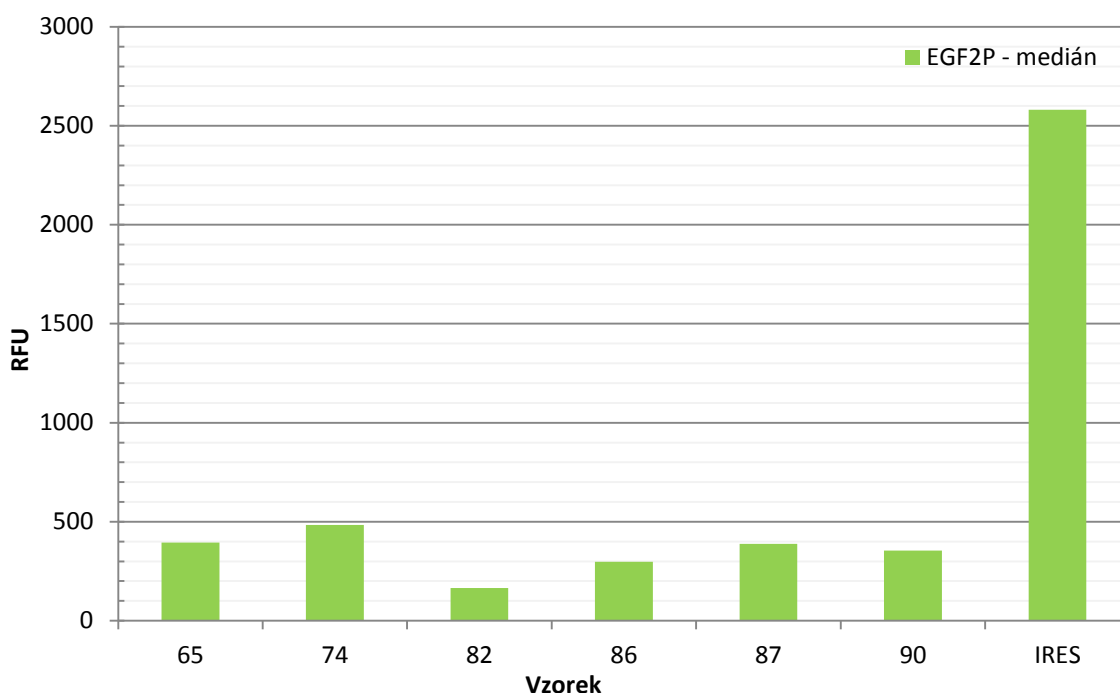
**Obr. 5.14.: Vyznačení nalezených mutací a delecí sekvenční IRES HCV ve vzorku od pacienta a jejich poloha v rámci sekundární struktury IRES.**

Červenými obdélníčky jsou vyznačeny báze, jejichž mutace byla nalezena v některém vzorku. Purpurovým obdélníčkem je znázorněna nalezená delece dvou bází. Modře je označen iniciační kodon IRES HCV.

(Upraveno podle Honda a kol., 1999)

#### 5.2.4. Analýza vzorků pomocí průtokové cytometrie

Na základě vyhodnocení sekvenačních dat jsem pro následnou analýzu pomocí průtokové cytometrie vybral vzorky 65, 74, 82, 86, 87 a 90. Vektory pRG nesoucí tyto vzorky IRES byly transientně transfekovány do buněčné linie CCL13 postupem popsáným v kapitole 4.2.3.9.1 a analyzovány na průtokovém cytometru podle postupu v kapitole 4.2.4.2. Pozitivní kontrolu představoval vektor pRG nesoucí nemutovanou sekvenci IRES HCV. Analýza na průtokovém cytometru probíhala tak, že byly vybrány pouze dsRED2 pozitivní buňky, tedy ty, které byly transfekovány a které produkovaly reportérové proteiny. V rámci této subpopulace buněk byla počítána míra intenzity fluorescence EGFP2. Hodnoty vynesené do grafu na obrázku 5.15. pak představují medián míry intenzity fluorescence EGFP2 vztažené na jednu dsRED2 pozitivní buňku spočítaný z cca 20 tisíc dsRED2 pozitivních buněk. Jak je patrné z grafu, nejvyšší hodnotu mediánu má vzorek buněk obsahující vektor s nemutovanou sekvencí IRES HCV. Všechny ostatní vzorky nesoucí vektor s mutací v IRES HCV mají pak hodnotu mediánu pouze pětínovou či menší.



**Obr. 5.15.: Vliv mutací v sekvenci IRES HCV na míru translace reportérového genu EGFP2.** Do grafu jsou vyneseny hodnoty mediánu míry intenzity fluorescence proteinu EGFP2, který byl produkován reportérovým genem pod kontrolou IRES HCV. Do výpočtu byly zavzaty pouze hodnoty buněk, které zároveň produkovaly fluorescenční protein dsRED2. Jednotlivé vzorky jsou označeny čísly, vzorek obsahující nemutovanou sekvenci IRES HCV je označen jako IRES. Na ose Y vyneseny hodnoty RFU (*relative fluorescent units*).

#### **5.2.5. Shrnutí**

Ve vzorcích IRES HCV od pacienta č. 4 byly nalezeny mutace. Jejich analýzou bylo ukázáno, že mutace v sekvenci IRES HCV mají vliv na míru translace závislou na IRES.

## 6. Diskuse

---

### 6.1. Využití buněčné linie HEK 293 pro studium IRES HCV

HCV je virus se silným orgánovým tropismem. Napadá především, ač rozhodně ne výlučně, játra a jaterní buňky, hepatocyty (Lerat a kol., 1998). Pro jeho studium v buněčné kultuře se tedy často používají takové buněčné linie, které jsou odvozené právě od jaterních buněk, jako jsou například linie Huh-7, HepG2 či Hep3B. Mohlo by se proto zdát zvláštní, proč jsem pro tvorbu stabilních buněčných linií sloužících jako základu systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů iniciace závislé na IRES HCV použil buněčné linie odvozené od ledvinných buněk, linie HEK 293. Důvodem je skutečnost, že naše laboratoř disponuje buňkami Flp-In 293 a 293 T-Rex s již integrovaným FRT místem v jejich genomu. Vnášení FRT místa například do buněčné linie Huh-7 *de novo* by bylo zdlouhavé a komplikované. V literatuře je popsáno mnoho případů, kdy byly nejaterní buněčné linie, jako jsou HeLa buňky odvozené od karcinomu děložního čípku či právě buněčná linie HEK 293 a její varianty, s úspěchem používány pro studium translace závislé na IRES HCV (Imbert a kol., 2003; Venkatesan a kol., 2003; Kato a kol., 2005; Wang a kol., 2005). Z publikace vzniklé v naší laboratoři vyplývá, že buněčné linie Huh-7 a CCL13 jsou pro tyto experimenty shodně použitelné (Vopalensky a kol., 2008). Nyní jsem navíc pomocí pokusů s transientní transfekcí tří různých buněčných linií HEK 293T, Huh-7 a CCL13 ověřil, že jsou pro tyto pokusy vhodné i buňky buněčné linie HEK 293T. Na základě těchto skutečností jsem se rozhodl použít buňky systému Flp-In 293 a 293 T-Rex pro tvorbu stabilních linií.

### 6.2. Umlčování cytomegalovirového promotoru v savčích buněčných liniích

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.1.1.2, časný promotor lidského cytomegaloviru, který je často používán pro expresi genů či konstruktů vnesených do savčích buněčných linií, bývá v některých buněčných liniích umlčován pomocí methylace. To byl ostatně hlavní důvod pro přípravu variant vektoru s lidským promotorem EF-1 $\alpha$ , u něhož tento jev popsán nebyl (Teschendorf a kol., 2002; Brooks a kol., 2004; Qin a kol., 2010). Původní snahou bylo porovnat exprese reportérových genů pod kontrolou obou promotorů v připravených stabilních liniích a vyhodnotit, který z nich produkuje větší množství



daného proteinu a jestli opravdu dochází v stabilně transfekovaných buňkách k umlčování CMV promotoru.

Pro základní analýzu, který z promotorů by byl pro následující použití teoreticky vhodnější, jsem z dat pocházejících z transientně transfekovaných buněčných kultur vypočetl poměr aktivity luciferasy Luc2 v buňkách transfekovaných vektorem nesoucím kazetu s IRES ku aktivitě luciferasy Luc2 v buňkách transfekovaných vektorem nesoucím kontrolní kazetu. Tento poměr byl tedy orientační hodnotou, která vyjadřovala „jak dobře funguje kontrolní kazeta oproti kazetě s IRES HCV“. Z tohoto výpočtu vyšly lépe vektory s promotorem CMV, které měly o jeden řád vyšší poměr mezi vektorem s IRES HCV a vektorem kontrolním. Ve světle výše zmíněného nebezpečí umlčování promotoru CMV jsem se rozhodl pro vytvoření stabilních buněčných linií s oběma sadami vektorů. Pro pozdější použití v rámci systému pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů IRES HCV byl i zmíněný poměr vypočtený pro vektory s promotorem EF-1 $\alpha$  dostatečný, aby bylo možno spolehlivě detekovat pokles míry translace zprostředkované IRES vůči kontrole.

Jelikož nebylo do termínu odevzdání této práce možno získat data z linií transfekovaných vektory s promotorem EF-1 $\alpha$ , nebylo bohužel možné ani určit a porovnat aktivity luciferas v jednotlivých liniích, ani provést evaluaci systému. Toto prodlení bylo způsobeno jak komplikacemi při přípravě vektorů (časté mutace v sekvencích IRES HCV a termostabilní vlásenky, obtížné sekvenování oblasti obsahující termostabilní vlásenku), tak při přípravě vlastních stabilních buněčných linií transfekovaných vektory s promotorem EF-1 $\alpha$  (v současné době vytvořené linie vznikly až třetím pokusem o jejich ustavení)

### **6.3. Rozdílná míra luciferasových aktivit mezi biologickými opakováními transientní transfekce buněčných kultur**

Při určování aktivit luciferas v transientně transfekovaných buněčných liniích HEK 293T a CCL13 bylo provedeno několik biologických opakování. Na třech prezentovaných biologických opakováních u těchto dvou buněčných linií je ale patrné, že naměřené hodnoty nejsou ve všech případech zcela konzistentní. Kolísá jak absolutní naměřená aktivita jednotlivých opakování, tak se mění poměr Luc2 ku RLuc pro různé bicistronické kazety. Hlavní příčinu rozdílnosti dat získaných z některých biologických opakování vidím v samotném základu, tedy v použitých buňkách a manipulaci s nimi. Ač je buněčná linie do určité míry charakterizovaná a uniformní, jedná se stále o biologický systém, který je ovlivňován velkou řadou vnějších i vnitřních faktorů.

Jak jsem se sám v průběhu své experimentální práce poučil, ne vždy je možno spolehnout se na prosté opakování protokolu. Buněčná kultura dosahovala někdy po stejné době nižší či vyšší konfluence, než tomu bylo v jiných případech, což mělo za následek velkou změnu v účinnosti transfekce buněčné kultury či množství reportérových proteinů, které taková kultura produkovala. K značným chybám může dojít i při vlastním měření luciferasových aktivit, neboť se jedná o velice citlivou metodu. Zde je tedy kladen důraz na zkušenost experimentátora a správnost provedení celého experimentu.

V datech je možné také nalézt zajímavý fenomén. V mnoha případech totiž byla silnější exprese reportérového genu Luc2 pod IRES HCV s mutací, než v případě varianty s opravenou sekvencí. V případě, že je tomu opravdu tak, vyvstává otázka, jak je v buněčné kultuře ovlivněna míra translace závislá na IRES HCV mutací v oblasti domény I, která se translaci podle literatury neúčastní, ba naopak její míru snižuje (Rijnbrand a kol., 1996)?

#### **6.4. Pročítání ribosomu na bicistronních kazetách**

Při konstrukci bicistronických kazet do nich byla vložena termostabilní vlásenka s cílem zamezit ribosomům překládajícím první cistron v translaci druhého cistronu. Jak si je ale možno povšimnout v Kapitolách 5.1.2 a 5.1.3, i přesto dochází v určité míře k produkci luciferasy kódované druhým cistronem i pokud není součástí expresní kazety IRES HCV. Tento jev, kdy dochází k pročítání, resp. reiniciaci, u bicistronických vektorů stejné či podobné stavby, je však popsán jak u kvasinek v původním článku T. Maška (Mašek a kol., 2007), od něhož mnou použité bicistronické kazety pochází, tak u savčích buněčných kultur v řadě dalších článků (Venkatesan a Dasgupta, 2001; Venkatesan a kol., 2003). Úsek mezi koncem jednoho genu a začátkem druhého však nesmí být vzdálený více než zhruba 100 nukleotidů (Rajkowitsch a kol., 2004).

#### **6.5. Odlišné hodnoty poměru aktivit luciferas při použití buněčné linie CCL13 oproti jiným buněčným liniím**

Zajímavým faktem, který přinesla analýza luciferasových aktivit ve vzorcích z transientně transfekovaných buněk buněčné linie CCL13, bylo zjištění, že v jejich případě neodpovídá poměr aktivit luciferas Luc2/RLuc poměrům vypočteným pro buněčné linie HEK 293T a Huh-7. V 8 z 12 případů přesáhla hodnota zmíněného poměru 100 %, což znamená, že aktivita luciferasy Luc2 byla vyšší, než aktivita luciferasy RLuc. Jinými slovy translaci závislá na IRES HCV poskytovala větší množství proteinu, než translaci

závislá na čepičce. Jak bylo popsáno v článku členů naší laboratoře, reportérový gel luc+ obsahuje kryptický promotor, který představuje místo alternativního začátku transkripce (Vopalensky a kol., 2008). Ač byl tento kryptický promotor velmi slabý (v porovnání s časným promotorem CMV zhruba 10-16×), bylo pro použité bicistronické kazety raději využito reportérového genu Luc2 (Mašek a kol., 2007). Jeho sekvence byla oproti luc+ optimalizována a jak bylo ukázáno v dalším článku pocházejícího z naší laboratoře, ke kryptické transkripci v jeho případě již nedochází Luc2 (Mašek a kol., 2013). Žádný důvod, proč by tedy měla být v buněčné linii CCL13 vyšší aktivita Luc2 oproti RLuc, nebyl po mnohých úvahách shledán. Můžeme tak jen spekulovat, zda by se mohlo jednat kupříkladu o alternativní sestřih mRNA, či o doposud neobjevený kryptický promotor nebo alternativní místo začátku translace, vše specifické pro buněčnou linii CCL13.

## **6.6. Problémy při analýze vzorků pomocí gelové elektroforesy v teplotním gradientu**

Analýza vzorků DNA pomocí TGGE poskytuje teoretické rozlišení mutace v jediném páru bází. I po mnohých optimalizacích v naší laboratoři se mně ani mému kolegovi A. Khawajovi nepodařilo dosáhnout takových výsledků, aby bylo možno rutinně pouze na základě analýzy pomocí TGGE bezpečně určit přítomnost či absenci mutace v konkrétním vzorku. Docházelo často k nedostatečné migraci vzorků v gelu a v teplotním gradientu, což mělo za následek jejich neúplnou separaci. Občas se také stávalo, že vzorky po stranách gelu putovaly jinou rychlostí než vzorky uprostřed a vznikala tzv. *Smiling Effect*, čímž se stala analýza téměř nemožnou. U některých vzorků také došlo ke vzniku jakéhosi smíru na gelu namísto vytvoření jasné ohraničeného proužku. To mohlo být například způsobeno kontaminací DNAsou či denaturací vzorku, který se pak pohyboval v gelu mnohem rychleji. Lepších výsledků než pomocí TGGE dosáhl můj kolega Anas Khawaja použitím gelové elektroforesy v gradientu denaturačního činidla (DGGE).

## **6.7. Ovlivnění výsledků analýzy mutací ve vzorcích IRES HCV prostřednictvím experimentálního uspořádání**

Jedním z cílů diplomové práce bylo určit, zda použití běžné *Taq* polymerasy může ovlivnit výsledky analýzy mutací ve vzorcích IRES HCV od pacientů. Tento problém je totiž velmi závažnou otázkou především při práci s genomy RNA virů, kdy existuje reálná

možnost zanesení mutací do vzorku uměle během zpracování pomocí PCR (Bracho a kol., 1998; Mullan a kol., 2001; Mullan a kol., 2004). Z toho důvodu je často doporučováno při takovýchto aplikacích použít polymerasy s opravnou 3'→5' exonukleasovou aktivitou (Malet a kol., 2003; Polyak a kol., 2005).

Abychom tyto informace ověřili, porovnali jsme mutace v IRES HCV ve stejném vzorku od pacienta, které jsem našel já, s mutacemi, které shromáždil Anas Khawaja. V souboru čítajícím celkem 35 vzorků jsme nenalezli žádnou specifickou mutaci, která by se zdála být vnesena do vzorku uměle za použití *Taq* polymerasy. Zdá se tedy, že v našem experimentálním uspořádání není použití *Taq* polymerasy nevhodné, ač je využití polymerasy s opravnou aktivitou samozřejmě s výhodou.

## **6.8. Vliv nalezených mutací ve vzorcích IRES HCV na míru translace závislé na IRES**

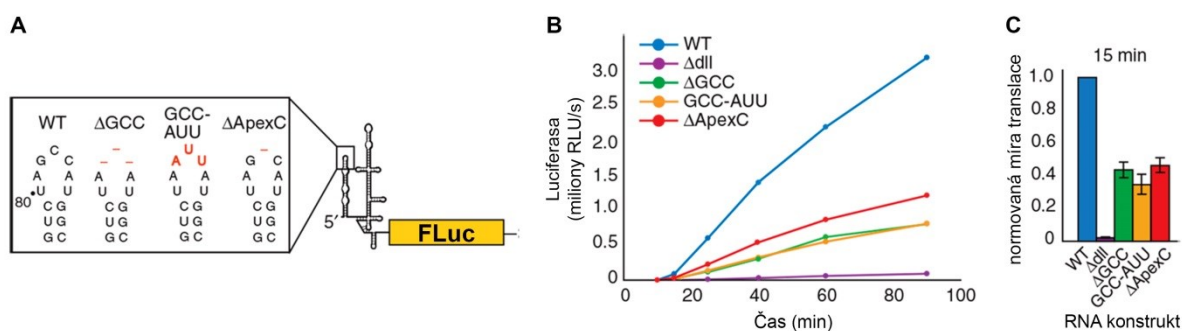
Lokalizace mutací sekvence IRES HCV nalezených ve vzorcích od pacienta spolu s navrženými důvody, proč by tyto mutace měly ovlivňovat míru translace závislou na IRES HCV, jsem uvedl v kapitole 5.2.3. Jedná se však o pouhé domněnky, založené na znalostech o struktuře a funkci IRES HCV nabytých z literatury. Pokud bychom se navíc chtěli zamýšlet nad jejich následky pro vlastní virus v těle hostitele, museli bychom ke komplexnosti sekundární a terciální struktury samotného IRES připočítat ještě jeho interakce s dalšími RNA strukturami genomu HCV, které jsou lokalizované v 3' NTR oblasti i v oblasti kódující virový polyprotein (Kim a kol., 2003; Romero-Lopez a Berzal-Herranz, 2009; Shetty a kol., 2013). Získáme tak složitou síť vzájemných vazeb, interakcí a ovlivňování na dlouhé vzdálenosti. Tímto obsáhlým tématem se zabýval můj kolega Anas Khawaja, který našel mnohem větší počet mutací.

## **6.9. Návrh mechanismu inhibice IRES HCV pomocí vitamínu B<sub>12</sub>**

Co se týče mechanismu inhibičních účinků vitamínu B<sub>12</sub> na iniciaci translace závislou na IRES HCV, není toho příliš mnoho známo. Kromě studií, které se snaží hledat mechanismus účinku vitamínu B<sub>12</sub> na řekněme spíše buněčné úrovni (Saunier a kol., 2003), je k dispozici několik publikací, jejichž autoři se zabývají možnostmi více či méně přirozené role kobalaminu jakožto regulátoru virové replikace a translace (Lott a kol., 2001; Li a kol., 2004). Pouze v jediné studii bylo ukázáno, že kobalamin neznámým způsobem interaguje s doménou IV IRES HCV a že jeho inhibiční schopnost spočívá v zadržení kompletního ribosomu na iniciačním kodonu HCV (Takyar a kol., 2002). Mechanismus,

kterým by docházelo k takovému ovlivnění prvního kroku elongace virového proteinu, však není, pokud je mi známo, v literatuře popsán. Při studiu literatury během zpracovávání literárního přehledu této práce jsem však našel zajímavou souvislost.

Ve studii publikované v tomto roce byla experimentálně ověřena funkce subdomény IIb IRES HCV spočívající v „přepnutí“ 80S ribosomu z fáze iniciace do fáze elongace. Při mutacích či delecích konkrétních bází distální vlásenky subdomény IIb (Obrázek 6.1-A) docházelo k tomu, že kompletní ribosomy byly sestaveny v iniciační oblasti s iniciačním kodonem IRES HCV lokalizovaným v P místě, avšak značné procento z těchto ribosomů (Tabulka 6.1) nebylo schopno první translokace a došlo k poklesu míry translace reportérového genu (Obrázek 6.1-B,C) (Filbin a kol., 2013). Popsaný fenomén přesně odpovídá situaci, kterou navozuje vitamin B<sub>12</sub> při svém inhibičním působení na translaci závislou na IRES HCV. Navíc jak bylo zmíněno v Kapitole 3.3.1, subdoména IIb je v kontaktu s ribosomálními proteiny S5, S14 a S16 (Kolupaeva a kol., 2000; Spahn a kol., 2001; Babaylova a kol., 2009) a její apikální část nejspíše upravuje polohu domény IV pro vazbu ternárního komplexu na iniciační kodon (Filbin a Kieft, 2011). Tyto skutečnosti mě proto přivádí na myšlenku, zda by účinek kobalaminu nemohl spočívat právě v ovlivnění dynamiky interakcí a změn sekundárních struktur domén II a IV.



**Obr. 6.1.: Vliv mutací v subdoméně IIb IRES HCV na míru translace reportérového genu.**

- (A) Přehled vytvořených variant fúzních RNA molekul obsahujících IRES HCV a reportérový gen FLuc kódující luciferasu světlušky rodu *Photinus pyralis*. V detailu apikální část subdomény IIb IRES HCV. Konstrukt označený jako WT obsahuje nemodifikovanou sekvenci IRES HCV; konstrukt ΔGCC má deletované tři nukleotidy distální smyčky; v konstrukt GCC-AUU byla původní sekvence GCC nahrazena bázemi AUU; konstrukt ΔApexC má delenovanou bázi C z apikálního konce vlásenky; nevyobrazený konstrukt ΔdII má deletovanou celou doménu II IRES HCV.
- (B) Graf znázorňující vztah mezi naměřenou aktivitou luciferasy (milióny detekovaný světelných záblesků [RLU, *relative light units*] za sekundu) v závislosti na čase. Jednotlivé konstrukty odlišeny barevně podle legendy.
- (C) Sloupcový graf znázorňující normovanou míru translace reportérového genu po 15 minutách vztaženou k hodnotě konstruktu WT. (Upraveno podle Filbin a kol., 2013)

**Tab. 6.1.: Mutace v distální oblasti subdomény IIb IRES HCV a jejich vliv na neschopnost ribosomů 80S translokovat se z iniciačního kodonu HCV.**

Tabulka obsahuje seznam reportérových fúzních molekul popsanych v (Filbin a kol., 2013) a procento kompletních ribosomů 80S, které nebyly schopny provést první translokační krok z iniciačního kodonu HCV. RNA konstrukt „wt RNA“ přitom obsahoval nezměněnou sekvenci IRES HCV. (Převzato z Filbin a kol., 2013)

RNA konstrukt	Procento netranslokováných ribosomů
wt RNA	33,3
ΔGCC	54,9
ΔapexC	58,0
GCC-AUU	62,0

## 6.10. Perspektiva ve výzkumu chemických inhibitorů IRES HCV

Ač se v klinické praxi objevují přípravky, které mají potenciál zlepšit účinnost duální terapie, či ji zcela nahradit, je mechanismus jejich účinku zacílen na jiné aspekty virové replikace a translace. Doposud nebyl objeven žádný inhibitor funkce IRES HCV, který by byl používán v klinické praxi. Jak jsem ale uvedl v literárním přehledu, existuje řada různých přístupů, jak inhibovat translaci závislou na IRES HCV. A jsou to právě chemické, nízkomolekulární, inhibitory, které mají velký potenciál. Jejich malá velikost a teoretická snadnost podání pacientům ve spojení se specifickým účinkem na strukturu či dynamiku IRES HCV z nich dělá teoreticky velmi účinný lék. Čím více je toho známo o sekundární a terciální struktuře IRES HCV a jeho interakcích s dalšími úseky genomu HCV a virovými či buněčnými proteiny, tím větší je šance, že bude nalezena taková molekula, která by účinným způsobem blokovala translaci virového polyproteinu.

## 7. Souhrn

---

- Vytvořil jsem vektor pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$  a vektory nesoucí bicistronické kazety:  
pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>opr</sub>\_L,  
pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_IRES<sub>mut</sub>\_L,  
pcDNA5/FRT/EF1 $\alpha$ /R\_L,  
pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>opr</sub>\_L,  
pcDNA5/FRT/TO/R\_IRES<sub>mut</sub>\_L,  
pcDNA5/FRT/TO/R\_L.
- Ověřil jsem prostřednictvím transienční transfekce bicistronickými vektory použitelnost savčí buněčné linie HEK 293T pro pokusy s translací závislou na IRES HCV.
- Připravil jsem systém pro hledání nízkomolekulárních inhibitorů translace závislé na IRES HCV v podobě stabilních savčích buněčných linií s integrovanými bicistronickými kazetami do genomu.
- Systém jsem nemohl plně verifikovat, neboť část stabilních buněčných linií nebyla do odevzdání práce v takové fázi, aby mohla být podrobena analýze.
- V sekvencích IRES HCV izolovaných ze vzorku od pacienta jsem našel mutace. Analýzou těchto mutovaných sekvencí IRES HCV jsem určil, že způsobují pokles iniciace translace závislé na IRES minimálně o 80 %.
- Porovnáním sekvencí IRES HCV pocházejících ze stejného vzorku od pacienta zpracovaného dvěma rozdílnými polymerasami nebylo prokázáno umělé vnášení mutací do vzorků
- Na základě analýzy literatury jsem navrhl možný mechanismus inhibice IRES HCV pomocí vitamínu B<sub>12</sub>.

## 8. Přílohy

### Příloha 1: Složení sekvenačních dat vzorků vybraných na základě TGGE.

První řádek (IRES) představuje referenční sekvenci IRES HCV 1a včetně příslušného číslování bází. Pod ní jsou pak pod sebou umístěny sekvence jednotlivých vzorků. Čísla u jejich sekvence vyznačují pozici v rámci molekuly DNA vzniklé při sekvenační reakci. Červeně jsou vyznačeny odlišnosti oproti referenční sekvenci. Žlutě je vyznačena poloha iniciačního kodonu. Parametry tvorby *multialignmentu* byly následující:

Scoring matrix Linear: (Mismatch 2, Opengap 4, ExtGap 1).

<b>IRES</b>	<b>1</b>	<b>GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG</b>
2	116	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
7	114	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
9	113	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
35	128	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
65	114	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
66	116	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
69	116	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
73	115	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
74	114	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
75	113	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
78	113	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
81	115	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
82	113	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
85	114	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
86	113	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
87	115	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
88	115	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
89	115	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
90	114	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
92	114	GCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAGTACTG
<b>IRES</b>	<b>61</b>	<b>TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC</b>
2	176	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
7	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
9	173	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
35	188	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
65	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
66	176	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
69	176	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
73	175	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
74	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
75	173	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
78	173	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
81	175	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
82	173	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
85	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
86	173	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTGATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
87	175	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
88	175	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
89	175	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
90	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC
92	174	TCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGAC



IRES	121	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
2	236	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
7	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
9	233	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
35	248	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
65	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
66	236	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
69	236	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
73	235	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
74	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
75	233	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
78	233	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
81	235	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
82	233	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
85	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
86	233	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
87	235	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
88	235	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
89	235	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
90	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
92	234	CCCCCCTCCCGGGGAGAGCCATAGTGGTCTGC
IRES	181	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
2	296	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
7	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
9	293	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
35	308	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
65	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
66	296	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
69	296	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
73	295	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
74	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
75	293	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
78	293	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
81	295	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
82	293	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
85	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
86	293	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
87	295	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
88	295	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
89	295	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
90	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
92	294	GACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGTGGCGTGCCCCC
IRES	241	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
2	356	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
7	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
9	353	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
35	368	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
65	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
66	356	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
69	356	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
73	355	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
74	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
75	353	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
78	353	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
81	355	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
82	353	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
85	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
86	353	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
87	355	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
88	355	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
89	355	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
90	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG
92	354	GCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGG

**IRES** 301 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
2 416 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
7 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
9 413 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
35 428 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
65 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
66 416 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
69 416 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
73 415 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
74 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
75 413 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
78 413 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
81 415 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
82 413 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
85 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
86 413 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
87 415 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGATCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
88 415 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
89 415 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
90 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC  
92 414 GTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAAC

**IRES 361 CTCAAAGAAA**

2 476 CTCAAAGAAA  
7 474 CTCAAAGAAA  
9 473 CTCAAAGAAA  
35 488 CTCAAAGAAA  
65 474 CTCAAAGAAA  
66 476 CTCAAAGAAA  
69 476 CTCAAAGAAA  
73 475 CTCAAAGAAA  
74 474 CTCAAAGAAA  
75 473 CTCAAAGAAA  
78 473 CTCAAAGAAA  
81 475 CTCAAAGAAA  
82 473 --CAAAGAAA  
85 474 CTCAAAGAAA  
86 473 CTCAAAGAAA  
87 475 CTCAAAGAAA  
88 475 CTCAAAGAAA  
89 475 CTCAAAGAAA  
90 474 CTCAAAGAAA  
92 474 CTCAAAGAAA

## 9. Seznam použité literatury

---

- Alotte, C., Martin, A., Caldarelli, S. A., Di Giorgio, A., Condom, R., Zoulim, F., Durantel, D. a Hantz, O. (2008). Short peptide nucleic acids (PNA) inhibit hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) dependent translation in vitro. *Antiviral Res* 80, 280-287.
- Alt, M., Renz, R., Hofschneider, P. H., Paumgartner, G. a Caselmann, W. H. (1995). Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology* 22, 707-717.
- Babaylova, E., Graifer, D., Malygin, A., Stahl, J., Shatsky, I. a Karpova, G. (2009). Positioning of subdomain III<sub>d</sub> and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome. *Nucleic Acids Res* 37, 1141-1151.
- Bakhshesh, M., Groppe, E., Willcocks, M. M., Royall, E., Belsham, G. J. a Roberts, L. O. (2008). The picornavirus avian encephalomyelitis virus possesses a hepatitis C virus-like internal ribosome entry site element. *J Virol* 82, 1993-2003.
- Bartenschlager, R., Frese, M. a Pietschmann, T. (2004). Novel Insights into Hepatitis C Virus Replication and Persistence. In *Advances in Virus Research*, pp. 71-180.
- Beaulieu, P. L., Bousquet, Y., Gauthier, J., Gillard, J., Marquis, M., Mckercher, G., Pellerin, C., Valois, S. a Kukulj, G. (2004). Non-nucleoside benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replicons in Huh-7 cells. *J Med Chem* 47, 6884-6892.
- Berry, K. E., Waghay, S. a Doudna, J. A. (2010). The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA* 16, 1559-1569.
- Berry, Katherine e., Waghay, S., Mortimer, Stefanie a., Bai, Y. a Doudna, Jennifer a. (2011). Crystal Structure of the HCV IRES Central Domain Reveals Strategy for Start-Codon Positioning. *Structure* 19, 1456-1466.
- Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J. D. a Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: Remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13, 1695-1706.
- Bracho, M. A., Moya, A. a Barrio, E. (1998). Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J Gen Virol* 79 ( Pt 12), 2921-2928.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. a Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103, 1143-1154.
- Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P. a Rubanyi, G. M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The journal of gene medicine* 6, 395-404.

- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. a Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Research* 20, 5041-5045.
- Busscher, G. F., Rutjes, F. P. a Van Delft, F. L. (2005). 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chemical reviews* 105, 775-791.
- Bygdeman, M., Swahn, M. L., Gemzell-Danielsson, K. a Svalander, P. (1993). Mode of action of RU 486. *Annals of medicine* 25, 61-64.
- Carnevali, M., Parsons, J., Wyles, D. L. a Hermann, T. (2010). A modular approach to synthetic RNA binders of the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 11, 1364-1367.
- Ceci, O., Margiotta, M., Mareello, F., Francavilla, R., Loizzi, P., Francavilla, A., Mautone, A., Impedovo, L., Ierardi, E., Mastroianni, M. a kol. (2001). Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 33, 570-575.
- Clarke, R. (2008). B-vitamins and prevention of dementia. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67, 75-81.
- Connolly, B. A., Potter, B. V. L., Eckstein, F., Pingoud, A. a Grotjahn, L. (1984). Synthesis and characterization of an octanucleotide containing the EcoRI recognition sequence with a phosphorothioate group at the cleavage site. *Biochemistry* 23, 3443-3453.
- Conte, D., Fraquelli, M., Prati, D., Colucci, A. a Minola, E. (2000). Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* 31, 751-755.
- Correll, C. C., Freeborn, B., Moore, P. B. a Steitz, T. A. (1997). Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* 91, 705-712.
- Da Rocha Gomes, S., Dausse, E. a Toulme, J. J. (2004). Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 820-826.
- Davis, D. R. a Seth, P. P. (2011). Therapeutic targeting of HCV internal ribosomal entry site RNA. *Antivir Chem Chemother* 21, 117-128.
- Dibrov, S. M., Ding, K., Brunn, N. D., Parker, M. A., Bergdahl, B. M., Wyles, D. L. a Hermann, T. (2012). Structure of a hepatitis C virus RNA domain in complex with a translation inhibitor reveals a binding mode reminiscent of riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5223-5228.
- Dibrov, S. M., Johnston-Cox, H., Weng, Y. H. a Hermann, T. (2007). Functional architecture of HCV IRES domain II stabilized by divalent metal ions in the crystal and in solution. *Angewandte Chemie (International ed in English)* 46, 226-229.
- Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Andreev, D. E., Ivanov, P. A., Dunaevsky, J. E., Merrick, W. C. a Shatsky, I. N. (2010). GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* 285, 26779-26787.
- Dounda, J. A. a Sarnow, P. (2007). Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. *Translational Control in Biology and Medicine*, 129-153.
- Dubuisson, J. (2007). Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13, 2406-2415.

- Ellington, A. D. a Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. a Holland, P. V. (1975). Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine* 292, 767-770.
- Feld, J. J. a Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436, 967-972.
- Filbin, M. E. a Kieft, J. S. (2011). HCV IRES domain IIb affects the configuration of coding RNA in the 40S subunit's decoding groove. *RNA* 17, 1258-1273.
- Filbin, M. E., Vollmar, B. S., Shi, D., Gonen, T. a Kieft, J. S. (2013). HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nature Structural and Molecular Biology* 20, 150-158.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. a Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75, 12047-12057.
- Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F. B., Ando, T. a Oya, A. (1994). Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 425-432.
- Hellen, C. U. a De Breyne, S. (2007). A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination. *J Virol* 81, 5850-5863.
- Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H. a Lemon, S. M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 73, 1165-1174.
- Honda, M., Brown, E. A. a Lemon, S. M. (1996a). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2, 955-968.
- Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. a Lemon, S. M. (1996b). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222, 31-42.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. a Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J. a kol. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2451-2455.
- Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M. P. a Schuster, C. (2003). Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *Journal of General Virology* 84, 1549-1557.
- Jackson, R. J. (2013). The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. a Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 113-127.

- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. a Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62, 2636-2643.
- Jefferson, E. A., Seth, P. P., Robinson, D. E., Winter, D. K., Miyaji, A., Osgood, S. A., Swayze, E. E. a Risen, L. M. (2004). Biaryl guanidine inhibitors of in vitro HCV-IRES activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 5139-5143.
- Ji, H., Fraser, C. S., Yu, Y., Leary, J. a Doudna, J. A. (2004). Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16990-16995.
- Jubin, R., Vantuno, N. E., Kieft, J. S., Murray, M. G., Doudna, J. A., Lau, J. Y. N. a Baroudy, B. M. (2000). Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop III<sub>d</sub> contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *Journal of Virology* 74, 10430-10437.
- Jucker, F. M., Heus, H. A., Yip, P. F., Moors, E. H. M. a Pardi, A. (1996). A Network of Heterogeneous Hydrogen Bonds in GNRA Tetraloops. *Journal of molecular biology* 264, 968-980.
- Kalliampakou, K. I., Psaridi-Linardaki, L. a Mavromara, P. (2002). Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett* 511, 79-84.
- Kapadia, C. R. (1995). Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *The Gastroenterologist* 3, 329-344.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M. a Wakita, T. (2005). Nonhepatic Cell Lines HeLa and 293 Support Efficient Replication of the Hepatitis C Virus Genotype 2a Subgenomic Replicon. *Journal of Virology* 79, 592-596.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Grech, A., Jubin, R. a Doudna, J. A. (2002). Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature structural biology* 9, 370-374.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R. a Doudna, J. A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194-206.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M. G., Lau, J. Y. a Doudna, J. A. (1999). The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *Journal of molecular biology* 292, 513-529.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T. a Nishikawa, S. (2003). RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *Journal of biochemistry* 133, 263-270.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Kuno, A., Hasegawa, T. a Nishikawa, S. (2005). A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III<sub>d</sub>. *Nucleic Acids Res* 33, 683-692.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Nishikawa, F., Fukuda, K., Hasegawa, T. a Nishikawa, S. (2009). Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 118-123.
- Kim, I., Lukavsky, P. J. a Puglisi, J. D. (2002). NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling. *Journal of the American Chemical Society* 124, 9338-9339.

- Kim, J. H., Park, S. M., Park, J. H., Keum, S. J. a Jang, S. K. (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J* 30, 2454-2464.
- Kim, J. J. (2007). Antiviral compositions and methods of using the same (USA).
- Kim, Y. K., Lee, S. H., Kim, C. S., Seol, S. K. a Jang, S. K. (2003). Long-range RNA–RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 9, 599-606.
- Klinck, R., Westhof, E., Walker, S., Afshar, M., Collier, A. a Aboul-Ela, F. (2000). A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 6, 1423-1431.
- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. a Hellen, C. U. (2000). An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 74, 6242-6250.
- Komar, A. A. a Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* 280, 23425-23428.
- Komar, A. A., Mazumder, B. a Merrick, W. C. (2012). A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene* 502, 75-86.
- Kondo, J. a Westhof, E. (2011). Classification of pseudo pairs between nucleotide bases and amino acids by analysis of nucleotide-protein complexes. *Nucleic Acids Res* 39, 8628-8637.
- Kuiken, C., Hraber, P., Thurmond, J. a Yusim, K. (2008). The hepatitis C sequence database in Los Alamos. *Nucleic Acids Res* 36, D512-516.
- Laletina, E., Graifer, D., Malygin, A., Ivanov, A., Shatsky, I. a Karpova, G. (2006). Proteins surrounding hairpin IIIe of the hepatitis C virus internal ribosome entry site on the human 40S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* 34, 2027-2036.
- Lancaster, A. M., Jan, E. a Sarnow, P. (2006). Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* 12, 894-902.
- Lange, C. M. a Zeuzem, S. (2013). Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 58, 583-592.
- Lavender, C. A., Ding, F., Dokholyan, N. V. a Weeks, K. M. (2010). Robust and generic RNA modeling using inferred constraints: a structure for the hepatitis C virus IRES pseudoknot domain. *Biochemistry* 49, 4931-4933.
- Leontis, N. B., Stombaugh, J. a Westhof, E. (2002). The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res* 30, 3497-3531.
- Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Traubaud, M.-A., Trépo, C. a Inchauspé, G. (1998). In Vivo Tropism of Hepatitis C Virus Genomic Sequences in Hematopoietic Cells: Influence of Viral Load, Viral Genotype, and Cell Phenotype. *Blood* 91, 3841-3849.
- Li, D., Lott, W. B., Martyn, J., Haqshenas, G. a Gowans, E. J. (2004). Differential effects on the hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site by vitamin B12 and the HCV core protein. *J Virol* 78, 12075-12081.
- Litovchick, A. a Szostak, J. W. (2008). Selection of cyclic peptide aptamers to HCV IRES RNA using mRNA display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Litovchick, A. a Szostak, J. W. (2009). Retraction for Litovchick and Szostak, Selection of cyclic peptide aptamers to HCV IRES RNA using mRNA display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7263.

- Lorsch, J. R. a Szostak, J. W. (1994). In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry* 33, 973-982.
- Lott, W. B., Takyar, S. S., Tuppen, J., Crawford, D. H., Harrison, M., Sloots, T. P. a Gowans, E. J. (2001). Vitamin B12 and hepatitis C: molecular biology and human pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4916-4921.
- Lukavsky, P. J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Research* 139, 166-171.
- Lukavsky, P. J., Kim, I., Otto, G. A. a Puglisi, J. D. (2003). Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature structural biology* 10, 1033-1038.
- Maag, D., Algire, M. A. a Lorsch, J. R. (2006). Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *Journal of molecular biology* 356, 724-737.
- Macejak, D. G. a Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90-94.
- Malet, I., Belnard, M., Agut, H. a Cahour, A. (2003). From RNA to quasispecies: a DNA polymerase with proofreading activity is highly recommended for accurate assessment of viral diversity. *Journal of virological methods* 109, 161-170.
- Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. a Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology* 66, 3225-3229.
- Martinez-Salas, E., Pineiro, D. a Fernandez, N. (2012). Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs. *Comparative and functional genomics* 2012, 391546.
- Mašek, T., Vopálenský, V., Horvath, O., Vortelova, L., Feketova, Z. a Pospisek, M. (2007). Hepatitis C virus internal ribosome entry site initiates protein synthesis at the authentic initiation codon in yeast. *J Gen Virol* 88, 1992-2002.
- Mašek, T., Vopalenský, V. a Pospíšek, M. (2013). The Luc2 gene enhances reliability of bicistronic assays. *Central European Journal of Biology* 8, 423-431.
- Melcher, S. E., Wilson, T. J. a Lilley, D. M. (2003). The dynamic nature of the four-way junction of the hepatitis C virus IRES. *RNA* 9, 809-820.
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L., Simmonds, P., Conradie, J. D., Neill, A. G. N., Dusheiko, G. M., Kew, M. C., Koshy, A. a kol. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: Implications for virus classification. *Journal of General Virology* 76, 2493-2507.
- Mchutchison, J. G., Patel, K., Pockros, P., Nyberg, L., Pianko, S., Yu, R. Z., Dorr, F. A. a Kwoh, T. J. (2006). A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 44, 88-96.
- Mokrejš, M., Mašek, T., Vopálenský, V., Hlubuček, P., Delbos, P. a Pospíšek, M. (2010). IRESite—a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research* 38, D131-D136.
- Mokrejš, M., Vopálenský, V., Kolenatý, O., Mašek, T., Feketová, Z., Sekyrová, P., Škaloudová, B., Kříž, V. a Pospíšek, M. (2006). IRESite: the database of experimentally verified IRES structures ([www.iresite.org](http://www.iresite.org)). *Nucleic Acids Research* 34, D125-D130.



- Moradpour, D., Penin, F. a Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5, 453-463.
- Mullan, B., Kenny-Walsh, E., Collins, J. K., Shanahan, F. a Fanning, L. J. (2001). Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions. *Analytical biochemistry* 289, 137-146.
- Mullan, B., Sheehy, P., Shanahan, F. a Fanning, L. (2004). Do Taq-generated RT-PCR products from RNA viruses accurately reflect viral genetic heterogeneity? *J Viral Hepat* 11, 108-114.
- Nadal, A., Martell, M., Lytle, J. R., Lyons, A. J., Robertson, H. D., Cabot, B., Esteban, J. I., Esteban, R., Guardia, J. a Gomez, J. (2002). Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J Biol Chem* 277, 30606-30613.
- Nulf, C. J. a Corey, D. (2004). Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res* 32, 3792-3798.
- Odreman-Macchioli, F., Baralle, F. E. a Buratti, E. (2001). Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J Biol Chem* 276, 41648-41655.
- Otto, G. A. a Puglisi, J. D. (2004). The Pathway of HCV IRES-Mediated Translation Initiation. *Cell* 119, 369-380.
- Parker, M. A., Satkiewicz, E., Hermann, T. a Bergdahl, B. M. (2011). An efficient new route to dihydropyranobenzimidazole inhibitors of HCV replication. *Molecules (Basel, Switzerland)* 16, 281-290.
- Parsons, J., Castaldi, M. P., Dutta, S., Dibrov, S. M., Wyles, D. L. a Hermann, T. (2009). Conformational inhibition of the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Nature Chemical Biology* 5, 823-825.
- Patil, V. M., R, G. K., Chudayeu, M., Gupta, S. P., Samanta, S., Masand, N. a Kaushik-Basu, N. (2012). Synthesis, in vitro and in silico NS5B polymerase inhibitory activity of benzimidazole derivatives. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* 8, 629-635.
- Paulsen, R. B., Seth, P. P., Swayze, E. E., Griffey, R. H., Skalicky, J. J., Cheatham Iii, T. E. a Davis, D. R. (2010). Inhibitor-induced structural change in the HCV IRES domain IIa RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7263-7268.
- Pelletier, J. a Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Pérard, J., Leyrat, C., Baudin, F., Drouet, E. a Jamin, M. (2013). Structure of the full-length HCV IRES in solution. *Nature Communications* 4.
- Pestova, T. V. a Hellen, C. U. (1999). Internal initiation of translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *Virology* 258, 249-256.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. a Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & development* 12, 67-83.
- Pisarev, A. V., Chard, L. S., Kaku, Y., Johns, H. L., Shatsky, I. N. a Belsham, G. J. (2004). Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol* 78, 4487-4497.

- Polyak, S. J., Sullivan, D. G., Austin, M. A., Dai, J. Y., Shuhart, M. C., Lindsay, K. L., Bonkovsky, H. L., Di Bisceglie, A. M., Lee, W. M., Morishima, C. a kol. (2005). Comparison of amplification enzymes for Hepatitis C Virus quasispecies analysis. *Virology journal* 2, 41.
- Poordad, F., McCone, J., Jr., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., Jacobson, I. M., Reddy, K. R., Goodman, Z. D., Boparai, N. a kol. (2011). Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* 364, 1195-1206.
- Prathiba, J. a Malathi, R. (2008). Group I introns and GNRA tetraloops: remnants of 'The RNA world'? *Molecular biology reports* 35, 239-249.
- Puglisi, J. D., Chen, L., Frankel, A. D. a Williamson, J. R. (1993). Role of RNA structure in arginine recognition of TAR RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 3680-3684.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B.-Z. a Lahn, B. T. (2010). Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE* 5, e10611.
- Rajkowitsch, L., Vilela, C., Berthelot, K., Ramirez, C. V. a McCarthy, J. E. G. (2004). Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *Journal of molecular biology* 335, 71-85.
- Ray, P. S. a Das, S. (2004). Inhibition of hepatitis C virus IRES-mediated translation by small RNAs analogous to stem-loop structures of the 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res* 32, 1678-1687.
- Reed, J. C., Stein, C., Subasinghe, C., Haldar, S., Croce, C. M., Yum, S. a Cohen, J. (1990). Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer research* 50, 6565-6570.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Carroll, A. R., Clarke, B. E., Rowlands, D. J. a Jackson, R. J. (1996). Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* 2, 867-878.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. a Jackson, R. J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* 14, 6010-6020.
- Rijnbrand, R. C., Abbink, T. E., Haasnoot, P. C., Spaan, W. J. a Bredenbeek, P. J. (1996). The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 226, 47-56.
- Rijnbrand, R. C. a Lemon, S. M. (2000). Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Current topics in microbiology and immunology* 242, 85-116.
- Romero-Lopez, C., Barroso-Deljesus, A., Puerta-Fernandez, E. a Berzal-Herranz, A. (2005). Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biological chemistry* 386, 183-190.
- Romero-Lopez, C. a Berzal-Herranz, A. (2009). A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA* 15, 1740-1752.
- Romero-López, C., Berzal-Herranz, B., Gómez, J. a Berzal-Herranz, A. (2012). An engineered inhibitor RNA that efficiently interferes with hepatitis C virus translation and replication. *Antiviral Research* 94, 131-138.

- Romero-López, C., Díaz-González, R., Barroso-Del Jesus, A. a Berzal-Herranz, A. (2009). Inhibition of hepatitis C virus replication and internal ribosome entry site-dependent translation by an RNA molecule. *Journal of General Virology* 90, 1659-1669.
- Romero-Lopez, C., Diaz-Gonzalez, R. a Berzal-Herranz, A. (2007). Inhibition of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation by an RNA targeting the conserved III<sub>f</sub> domain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 2994-3006.
- Rosenberg, P. a Hagen, K. (2011). Serum B12 levels predict response to treatment with interferon and ribavirin in patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 18, 129-134.
- Roy, S., Gupta, N., Subramanian, N., Mondal, T., Banerjee, A. C. a Das, S. (2008). Sequence-specific cleavage of hepatitis C virus RNA by DNAzymes: inhibition of viral RNA translation and replication. *J Gen Virol* 89, 1579-1586.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P. a Kohn, L. D. (2003). Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 77, 546-559.
- Seetharam, B. a Yammani, R. R. (2003). Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Expert reviews in molecular medicine* 5, 1-18.
- Seth, P. P., Miyaji, A., Jefferson, E. A., Sannes-Lowery, K. A., Osgood, S. A., Propp, S. S., Ranken, R., Massire, C., Sampath, R., Ecker, D. J. a kol. (2005). SAR by MS: Discovery of a new class of RNA-binding small molecules for the hepatitis C virus: Internal ribosome entry site IIA subdomain. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 7099-7102.
- Sharma, S. D. (2010). Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 131, 17-34.
- Shetty, S., Stefanovic, S. a Mihailescu, M. R. (2013). Hepatitis C virus RNA: molecular switches mediated by long-range RNA-RNA interactions? *Nucleic Acids Res* 41, 2526-2540.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G. a kol. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N. a Hellen, C. U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 72, 4775-4782.
- Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U. a Pestova, T. V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes & development* 24, 1787-1801.
- Sonenberg, N. a Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A. a Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
- Spitzer, S. a Eckstein, F. (1988). Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 16, 11691-11704.
- Steitz, T. A. (2008). Structural insights into the functions of the large ribosomal subunit, a major antibiotic target. *The Keio journal of medicine* 57, 1-14.

- Stoneley, M. a Willis, A. E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23, 3200-3207.
- Sy, T. a Jamal, M. M. (2006). Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3, 41-46.
- Szewczak, A. A. a Moore, P. B. (1995). The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *Journal of molecular biology* 247, 81-98.
- Takyar, S. S., Gowans, E. J. a Lott, W. B. (2002). Vitamin B12 stalls the 80 S ribosomal complex on the hepatitis C internal ribosome entry site. *Journal of molecular biology* 319, 1-8.
- Tallet-Lopez, B., Aldaz-Carroll, L., Chabas, S., Dausse, E., Staedel, C. a Toulme, J. J. (2003). Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res* 31, 734-742.
- Teschendorf, C., Warrington, K. H., Jr., Siemann, D. W. a Muzyczka, N. (2002). Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer research* 22, 3325-3330.
- Tomei, L., Altamura, S., Bartholomew, L., Biroccio, A., Ceccacci, A., Pacini, L., Narjes, F., Gennari, N., Bisbocci, M., Incitti, I. a kol. (2003). Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 77, 13225-13231.
- Tong, M., Schiff, E., Jensen, D. M., Jacobson, I., Everson, G., Mchutchinson, J. G., Aitchison, R. A., Gordon, G. S., Babcock, S. A., Enright, J. a kol. (2002). Preliminary analysis of a phase II study of Heptazyme, a nuclease resistant ribozyme targeting hepatitis C virus RNA. *Hepatology* 36.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. a Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66, 1476-1483.
- Tuerk, C. a Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Valášek, L. S. (2012). 'Ribozoomin'--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Current protein & peptide science* 13, 305-330.
- Van Regenmortel, M. H., International a Fauquet, C. M. (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Academic Press).
- Venkatesan, A. a Dasgupta, A. (2001). Novel fluorescence-based screen to identify small synthetic internal ribosome entry site elements. *Molecular and Cellular Biology* 21, 2826-2837.
- Venkatesan, A., Sharma, R. a Dasgupta, A. (2003). Cell cycle regulation of hepatitis C and encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site-mediated translation in human embryonic kidney 293 cells. *Virus Research* 94, 85-95.
- Vicens, Q. a Westhof, E. (2003). RNA as a drug target: the case of aminoglycosides. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 4, 1018-1023.
- Vopalensky, V., Masek, T., Horvath, O., Vicensova, B., Mokrejs, M. a Pospisek, M. (2008). Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. *RNA* 14, 1720-1729.

- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N. a Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* *1*, 526-537.
- Wang, C., Sarnow, P. a Siddiqui, A. (1994). A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* *68*, 7301-7307.
- Wang, Q., Contag, C. H., Ilves, H., Johnston, B. H. a Kaspar, R. L. (2005). Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *12*, 562-568.
- Wang, W., Préville, P., Morin, N., Mounir, S., Cai, W. a Siddiqui, M. A. (2000). Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *10*, 1151-1154.
- Westermann, P. a Nygard, O. (1984). Cross-linking of mRNA to initiation factor eIF-3, 24 kDa cap binding protein and ribosomal proteins S1, S3/3a, S6 and S11 within the 48S pre-initiation complex. *Nucleic Acids Res* *12*, 8887-8897.
- Zeuzem, S., Andreone, P., Pol, S., Lawitz, E., Diago, M., Roberts, S., Focaccia, R., Younossi, Z., Foster, G. R., Horban, A. a kol. (2011). Telaprevir for retreatment of HCV infection. *The New England journal of medicine* *364*, 2417-2428.
- Zeuzem, S., Buggisch, P., Agarwal, K., Marcellin, P., Sereni, D., Klinker, H., Moreno, C., Zarski, J. P., Horsmans, Y., Mo, H. a kol. (2012). The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology* *55*, 749-758.
- Zhang, H., Hanecak, R., Brown-Driver, V., Azad, R., Conklin, B., Fox, M. C. a Anderson, K. P. (1999). Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *43*, 347-353.
- Zhao, W. D. a Wimmer, E. (2001). Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* *75*, 3719-3730.
- Zhou, S., Ryneerson, K. D., Ding, K., Brunn, N. D. a Hermann, T. (2013). Screening for inhibitors of the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.
- Zhou, Y., Gregor, V. E., Ayida, B. K., Winters, G. C., Sun, Z., Murphy, D., Haley, G., Bailey, D., Froelich, J. M., Fish, S. a kol. (2007). Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: Novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *17*, 1206-1210.
- Ministerstvo zdravotnictví USA.** Antiviral Activity and Safety of 3 Different Doses of Mifepristone in Hepatitis C Infected Patients (NCT00255177) [online] (2009-09-30) [cit. 2013-07-28] Dostupné z WWW: <<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00255177>>